

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Autofágiában szereplő gének azonosítása *Drosophilában*: az ubiquitin-proteaszóma rendszer autofágiát szabályozó szerepe

Varga Ágnes

biológus

Témavezető:

Juhász Gábor PhD., tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola

iskolavezető: Erdei Anna DSc., egyetemi tanár

Molekuláris sejt- és neurobiológia program

programvezető: Sass Miklós DSc., egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék



Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDTÉSJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. Az autofágia	7
2.1.1. Az autofágia folyamata.....	8
2.1.1.1. Autofágia szabályozás és indukció.....	9
2.1.1.2. Izoláló membrán kialakulás.....	10
2.1.1.3. Autofagoszóma növekedés	10
2.1.1.4. Autolizoszóma kialakulás és lebontás	11
2.1.2. Az autofágia fiziológiás és patológias jelentősége.....	13
2.1.2.1. Minőség ellenőrzés	13
2.1.2.2. A sejt anyag- és energiellátása	14
2.1.2.3. Sejt és szövet átrendeződés.....	14
2.1.2.4. Védelem a patogének ellen, immunitás.....	15
2.2. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer.....	16
2.2.1. Az ubiquitin és az ubiquitin-konjugáció.....	16
2.2.2. A proteaszóma felépítése.....	19
2.2.3. Az UPS fiziológiás és patológias szerepe.....	20
2.3. Az ecetmuslica, mint modellállat.....	23
2.4. Genetikai technikák az ecetmuslica kutatásban.....	25
2.4.1. Az UAS-Gal4 rendszer.....	25
2.4.2. Az RNS interferencia	26
2.4.3. Az Flp/FRT rendszer	28
2.4.4. Teljes genom vizsgálatok	28
3. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI	30
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
4.1. Felhasznált törzsek és az állatok tartása	31
4.2. Proteaszóma aktivitás teszt.....	31
4.3. Fénymikroszkópos vizsgálatok.....	31
4.4. Immuncitokémia	32

4.5. Reverz-transzkriptáz PCR	32
4.6. Western blot	33
4.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	34
4.8. Statisztika	34
5. EREDMÉNYEK	36
5.1. Teljes genom RNS interferencia szűrés	36
5.1.1. Az elsődleges szűrés	36
5.1.2. A másodlagos szűrések.....	38
5.1.3. A tesztek alapján kialakított fenotípus kategóriák.....	42
5.1.3.1. Az ATG csoport	42
5.1.3.2. Az autofagoszóma csoport	43
5.1.3.3. Az autolizoszóma csoport.....	44
5.2. Az ubiquitin proteaszóma rendszer szerepe az autofágiában	46
5.2.1. Különböző proteaszóma alegységek csendesítése a proteaszómális lebontás gátlásához vezet.....	46
5.2.2. A proteaszómális lebontás károsodása fokozza a bazális és éhezéssel indukált autofágiát.....	50
5.2.3. Különböző proteaszóma alegységek csendesítése citoplazmás aggregátumok felhalmozódásához vezet és növeli az autofág fluxot	53
5.2.4. A hipoxia jelátvitel aktiválása autofágiát indukál Drosophilában.....	56
5.2.5. A proteaszómális lebontás károsodása és a hipoxia jelátvitel indukció nem vezet apoptózishoz.....	59
5.2.6. A proteaszóma gátlás indukálta autofágiához Atg gének és a sima/Hif1 α szükségesek	60
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	63
7. ÖSSZEFOGLALÁS	67
8. SUMMARY	68
9. IRODALOM	69
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	80
11. FÜGGELÉK	81

RÖVIDTÉSJEGYZÉK

- 4EBP – eIF-4E binding protein (eIF-4E kötő fehérje)
- AEL – after egg laying (petekelés után)
- AMPK – AMP-activated protein kinase (AMP aktiválta protein kináz)
- APC – anaphase promoting complex (anafázis segítő komplex)
- ATG – autophagy- related gene (autofágia gén)
- ATP – adenosin-trifoszfát
- BNIP3 – BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BCL2/adenovírus E1B 19 kDa fehérje kölcsönható fehérje 3)
- CDK – cyclin-dependent kinase (ciklin dependens kináz)
- CMA – chaperone-mediated autophagy (chaperon-mediált autofágia)
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole
- dsRNS – double stranded RNA (duplaszálú RNS)
- DUB – de-ubiquitylating enzyme (deubiquitináló enzim)
- E1 – ubiquitin aktiváló enzim
- E2 – ubiquitin-konjugáló enzim
- E3 – ubiquitin-protein ligáz
- ER – endoplazmatikus retikulum
- ERAD – ER-associated protein degradation (ER kapcsolt fehérje lebontás)
- Flp – flippase (flippáz)
- FRT – Flp recombination target (Flp rekombináció hely)
- GFP – green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)
- HECT – homologous to the E6-AP carboxyl terminus (E6-AP C-terminális homológ)
- Hif1 – hypoxia-inducible factor 1 (hipoxia indukálta faktor 1)
- HOPS – homotypic fusion and vacuole protein sorting
- HRE – hypoxia responsive element (hipoxia válasz elem)
- Hsc70 – heat shock 70 kDa protein (70 kDa hősokk fehérje)
- IAP – inhibitor of apoptosis proteins
- IFN γ – interferon γ
- IRS1 és IRS2 – insulin receptor substrate 1 and 2 (inzulin receptor szubsztrát 1 és 2)
- IR – inverted repeat
- L1, L2 és L3 – első, második és harmadik lárvastádium

Lamp1 – lysosomal-associated membrane protein 1 (lizoszóma asszociált membrán fehérje 1)

Lamp2A – lysosome-associated membrane protein 2A (lizoszóma asszociált membrán fehérje 2A)

LIR – LC3 interacting region (LC3 kölcsönható régió)

LTR – LysoTracker Red

MHCI – major histocompatibility complex class I (fő hisztokompatibilitási komplex I)

MHCII – major histocompatibility complex class II (fő hisztokompatibilitási komplex II)

ODD – oxygen dependent degradation domain (oxigén függő degradációs domén)

PAS – pre-autophagosomal structure/phagophore assembly site (pre-autofagoszómális struktúra/fagofór összeszerelődési hely)

PCR – polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)

PDK1 – phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (foszfoinozítid függő protein kináz1)

PE – foszfatidil-etanolamin

PI3K – foszfatidil-inozitol -3-kináz

PI3P – foszfatidil-inozitol-3-foszfát

PIP2 – foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PIP3 – foszfatidil-inozitol-3,4,5-triszfoszfát

PINK1 – PTEN-induced putative kinase protein 1 (PTEN indukálta protein kináz 1)

PKB – protein kináz B

Pomp – proteasome maturation protein (proteaszóma érési fehérje)

Rag – Ras-related small GTPases (Ras kapcsolt kis GTPázok)

Rheb – Ras homolog enriched in brain

RING – really interesting new gene

RISC – RNA induced silencing complex (RNS indukálta csendesítő komplex)

RNSi – RNS interferencia

Rpn – regulatory particle non-ATPase (nem ATPáz szabályozó alegység)

Rpt – regulatory particle triple-A protein (ATPáz szabályozó alegység)

S6K – ribosomal protein S6 kinase (riboszómális fehérje S6 kináz)

SCF – Skp, Cullin, F-box containing complex (Skp, Cullin, F-box tartalmú komplex)

siRNS – small interfering RNA (kis interferáló RNS)

TAP – transporter associated with antigen processing (antigén feldolgozáshoz kapcsolt transzporter)

TCR – T cell receptor (T-sejt receptor)

TOR – target of rapamycin (rapamicin célfehérje)

TSC1/2 – tuberous sclerosis protein 1/2

UAS – upstream activating sequence (upstream aktiváló szekvencia)

UBA – ubiquitin-associated domain (ubiquitin kapcsolt domén)

UPR – unfolded protein response (hibás konformációjú fehérje válasz)

UPS – ubiquitin proteasome system (ubiquitin-proteaszóma rendszer)

VEGF – vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor)

Vha – vacuolar H⁺ ATPase (vakuoláris proton ATPáz)

Vhl – von Hippel-Lindau

Vps – vacuolar protein sorting

1. BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtekben két útvonal felelős a szabályozott fehérjelebontás nagyrészéért: az ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPS) és az autofágia. E két folyamat teremti meg az egyensúlyt a sejt felépítő és lebontó folyamatai között, így hozzájárulnak a sejt homeodinamikájának fenntartásához. Az autofágia (sejtes önemésztés) evolúciósan erősen konzervált sejtbiológiai folyamat, amely során a sejt saját anyagait lizoszómák segítségével bontja le. Az alapszintű, bazális autofágia a sérült, előregedett sejtalkotók és a hosszú féléletidejű, vagy nem megfelelő konformációjú fehérjék és aggregátumok folyamatos eltávolítása révén alapvető fontosságú a szervezet túlélése, az állandó megújulás szempontjából. Az autofágia bizonyos külső (pl. éhezés) és belső ingerek (pl. hormonális hatások) következtében gyakran tömeges méreteket ölt. Az UPS elsősorban a rövid féléletidejű fehérjék kontrollált lebontását, az előregedett vagy felesleges fehérjék újrahasznosítását, valamint a szabályozó fehérjék gyors eltávolítását végzi, így számos folyamat regulációjában is részt vesz. Sokáig azt gondolták, hogy ez a két folyamat független egymástól, csupán párhuzamos lebontási útvonalak, mára azonban ez a nézet megváltozott (Korolchuk és mtsai, 2010). Ismert, hogy vannak közös szubsztrátjaik és szabályozó molekuláik, és hogy az autofágia károsodása ubiquitinált fehérjék felhalmozódásához vezet ép proteaszóma-működés esetén is. Ennek az az oka, hogy ubiquitinált fehérjék autofágia útján is degradálódhatnak, a p62/SQSTM-1 típusú szelektív autofágia receptorok közvetítésével.

A szabályozott intracelluláris lebontás igen fontos, az egyensúly felbomlása számos patológiás folyamat során is megfigyelhető. Neurodegeneratív betegségekben a felhalmozódó fehérje aggregátumok autofág lebontása lassítja, de akár meg is akadályozhatja a kór kialakulását. Túlzott autofág aktivitás viszont programozott sejthalálhoz is vezethet. A tumorigenezis során az autofágia működése segítheti a daganatok kialakulását a gyakran tápanyaghiányos tumorszövetek túlélésének támogatásával. Ugyanakkor az autofágia tumorszupresszor folyamatként is viselkedik: a nem megfelelően működő autofágia a genomkárosodás és a genetikai instabilitás révén vezethet tumor kialakulásához. Tehát az autofágia szabályozásának és molekuláris mechanizmusának, illetve az UPS-autofágia kapcsolatának részletes megismerése többsejtű szervezetekben nem csak alapkutatási szempontból fontos, hanem segítséget nyújthat emberi betegségek kezelésében és új gyógymódokhoz vezethet.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Kísérleteink során az autofágia molekuláris hátterét, valamint az autofágia és az ubiquitin-proteaszóma rendszer kapcsolatát vizsgáltuk. A következőkben szeretném bemutatni a vizsgált folyamatokat, modellállatunkat, az ecetmuslicát, valamint a felhasznált genetikai rendszereket.

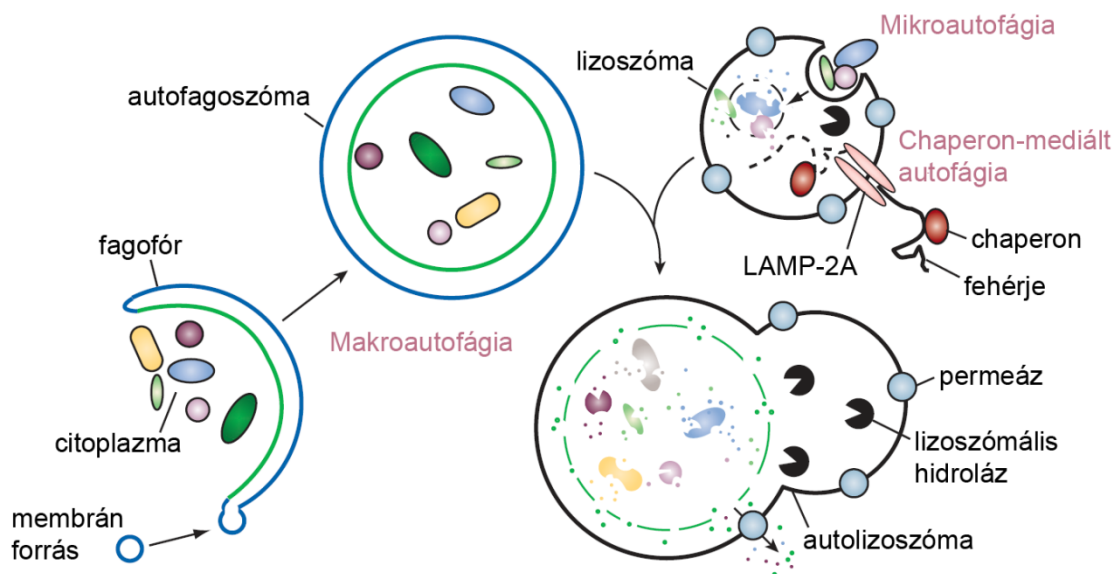
2.1. Az autofágia

Az autofágia szó görög eredetű, jelentése önmérsztés, ami utal az intracelluláris folyamatra, amellyel a sejt citoplazmarészletek, sejtorganellumok és fehérjék lebontását végzi a lizoszómális rendszeren keresztül. A felszabaduló kis molekulákat a sejt felépítő folyamataihoz vagy energia (ATP) szintézishez használja, így alapvetően a túlélést segíti. Az autofágia kifejezést először Christian de Duve használta 1963-ban, aki a lizoszómát is felfedezte, majd később Nobel díjat kapott sejtbiológiai kutatásaiért.

Az autofágiának három fő típusa van: mikro-, chaperon-mediált és makroautofágia, amelyek különböznek mechanizmusukban, funkciójukban és szubsztrát-specifitásukban. A mikroautofágia során a lebontásra szánt anyagok közvetlenül a lizoszómális membrán invaginációin át jutnak be a lizoszómába. A chaperon-mediált autofágia (CMA) esetén a Hsc70 (heat shock 70 kDa protein) citoplazmatikus chaperon ko-chaperonok közreműködésével ismeri fel a KFERQ motívumot tartalmazó citoplazmatikus szubsztrát fehérjét. A komplex a Lamp2A (lysosome-associated membrane protein 2A) lizoszómális membránfehérjéhez kötődik, majd a letekeredett fehérje transzlokálódik a lizoszómába, ahol a proteázok lebontják (Majeski és Dice, 2004). A makroautofágia során a citoplazma egy részletét kettős membrán veszi körbe, majd a kialakuló autofagoszóma lizoszómával fúzionál (**1. ábra**). A mikro- és makroautofágia képes nagyobb struktúrák lebontására szelektív és nem szelektív módon egyaránt, a CMA azonban csak szolubilis fehérjéket bont szelektív mechanizmussal. Munkám során a makroautofágiával foglalkoztam, így a továbbiakban az autofágia kifejezés alatt mindig ezt értem.

Az autofágia szerepének pontosabb megértéséhez meg kell különböztetnünk több esetet. Egyrészt beszélhetünk alapszintű autofágiáról, amely normál körülmények között a citoplazma folyamatos fehérje- és organellum-forgalmát (turnover) biztosítja. Másrészt, indukált autofágia például éhezés esetén a sejt anyag- és energia ellátásáért felel, valamint

a fejlődési autofágia szöveti átrendeződéskor a kialakuló, differenciálódó szervekben megvégeződik (Mizushima, 2005).



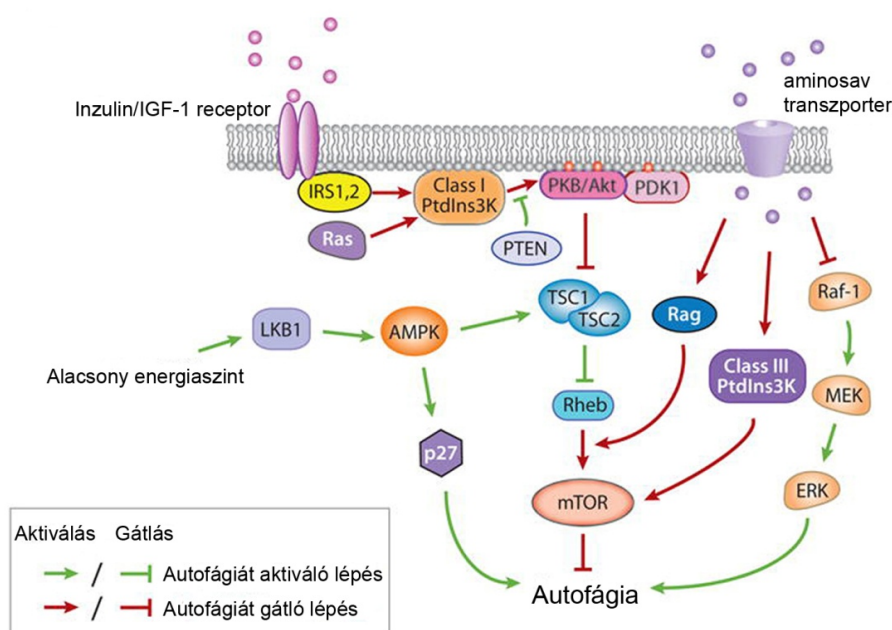
1. ábra Az autofágia három fő típusa. Mikroautofágiával a lebontandó anyagok a membrán invaginációjával jutnak be a lizoszómába. A chaperon-mediált autofágia során a chaperon-komplex a megkötött fehérjét a LAMP-2A membránfehérjén keresztül küldi lebontásra a lizoszómába. A makroautofágia során a citoplazmatikus anyagot kettős membrán veszi körül, majd az autofagoszóma lizoszómával fúzionál (Mizushima és mtsai, 2008 után módosítva).

2.1.1. Az autofágia folyamata

Az autofágia folyamatában részt vevő géneket először élesztőben írták le (Tsukada és Ohsumi, 1993). Később bevezették az egységes ATG (autophagy-related) nevezéktant a könnyebb áttekinthetőség végett (Klionsky és mtsai, 2003). Mára több mint 30 ATG gént írtak le, amelyek közül a legtöbbnek az ortológja ismert magasabbrendű eukariótákban, ami a folyamat nagymértékű konzerváltságára utal. A géneket komplexekre oszthatjuk az autofagoszóma formálódásban betöltött szerepük szerint: Atg1 kináz komplex (Atg1, Atg13, Atg101, FIP200), Vps34 lipid kináz komplex (Atg6, Atg14, Vps15, Vps34), PI3P (foszfatidil-inozitol-3-foszfát) effektor komplex (Atg2, Atg18a), Atg9 membrán transzport fehérje, és végül az ubiquitin-szerű konjugációs rendszerek (Atg3, 5, 7, 8a, 10, 12, 16) (**3. ábra**).

2.1.1.1. Autofágia szabályozás és indukció

Az autofágia legfőbb kiváltója az éhezés. A sejt metabolikus útvonalainak fő szabályozója a TOR (target of rapamycin) szerin/treonin kináz, amely integrálja a tápanyagok (aminosav- és energiaellátás) és a növekedési faktorok intra- és extracelluláris szignáljait, így szabályozza a sejtnövekedést, a sejtciklust és az autofágiát. Az inzulin és az inzulin-szerű növekedési hormonok az inzulin receptorhoz kötnek (**2. ábra**), aminek hatására a receptor autofoszforylálódik a tirozin oldalláncokon. Ezekhez a foszfo-tirozinokhoz köt, majd foszforylálódik az IRS1 és IRS2 (insulin receptor substrate 1 and 2) állvány fehérje, amelyekhez többek között az I-es típusú PI3K (foszfatidil-inozitol-3 kináz) is kapcsolódik. A PI3K a membrán PIP2-t (foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát) foszforylálja, a keletkező PIP3-hoz (foszfatidil-inozitol-3,4,5-triszfoszfát) köt a PKB (protein kináz B)/Akt és az aktivátora, a PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1). A PDK1 foszforylálja, így aktiválja a PKB/Akt-ot, ami foszforylációval gátolhatja a TSC1/2 (tuberous sclerosis protein 1/2) komplexet, így a Rheb (Ras homolog enriched in brain) aktív formában marad és aktiválja a TOR komplexet. A TOR érzékeli az aminosav szintet is a Rag (Ras-related small GTPases) fehérjéken keresztül, az energiaszintet az AMPK-n (AMP-activated protein kinase) keresztül, valamint szabályozza a Ras jelátviteli útvonal is. Jó tápanyag ellátottság esetén a TOR aktív, így az S6K (ribosomal protein S6 kinase) és a 4EBP (eIF-4E binding protein) célfehérjéin keresztül serkeni a növekedést, míg az Atg1 és Atg13 foszforylációjával gátolja az autofágiát (Scott és mtsai, 2004; Rusten és mtsai, 2004; Scott és mtsai, 2007; He és Klionsky, 2009).



2. ábra Az autofágia szabályozása. Az autofágiát szabályozza az amino savak, növekedési hormonok és az energia szintje. A részleteket lásd a szövegben (He és Klionsky, 2009 alapján).

Éhezéskor vagy rapamicin kezelés hatására az Atg1 felszabadul a TOR gátló hiperfoszforilációja alól, amely az Atg13-mal, FIP200-al és az Atg101-el alkot stabil komplexet *Drosophilában*, emlős sejtekhez hasonlóan. A hipofoszforilált Atg1 foszforilálja a komplex többi tagját és önmagát is, így indukálja az autofágiát (Chang és Neufeld, 2009).

2.1.1.2. Izoláló membrán kialakulás

Az Atg fehérjék az autofagoszóma képződés helyén halmozódnak fel, amelyet PAS-nak (pre-autophagosomal structure/phagophore assembly site) is hívunk. Az itt keletkező membránzsákot fagofórnak vagy izoláló membránnak nevezzük. A membrán eredete máig vitatott: ER (endoplazmatikus retikulum), Golgi, mitokondrium vagy plazmamembrán is szerepet játszhat mint forrás (Tooze és Yoshimori, 2010). A fagofór növekedése, majd záródása után egy kettős membrán borítású vezikula (autofagoszóma) keletkezik (**3. ábra**). A külső membrán először késői endoszómával fúzionálhat amfiszómát alkotva, majd lizoszómával olvad össze, így létrejön az autolizoszóma, ahol a lebontás történik (Rusten és mtsai, 2007; Juhasz és mtsai, 2008).

A fagofór formálódás kezdeti helye egy PI3P gazdag régió, amelyet a Vps34 (vacuolar protein sorting 34), egy III-as típusú PI3K hoz létre a lipid kináz komplex többi tagjának segítségével (Juhasz és mtsai, 2008). Az Atg18-Atg2 komplex a fagofórhoz toborzódik, az Atg18 köt a PI3P-hoz és állványfehérjeként szolgál. Az Atg9 az egyetlen transzmembrán Atg fehérje. A membrán transzportban és reciklizálásban játszik szerepet. Élesztőben leírták, hogy a Golgiból származó kis Atg9 pozitív vezikulák a PAS-hoz vándorolnak és fúzionálnak, így létrehozva a fagofór prekursorát, azaz membránforrásként szolgálnak, majd később reciklizálódnak (Yamamoto és mtsai, 2012). Az Atg9 vezikulák mellett azonban feltehetően további lipidforrásokra van szükség, amelyeknek pontos feltérképezése jelenleg is folyamatban van.

2.1.1.3. Autofagoszóma növekedés

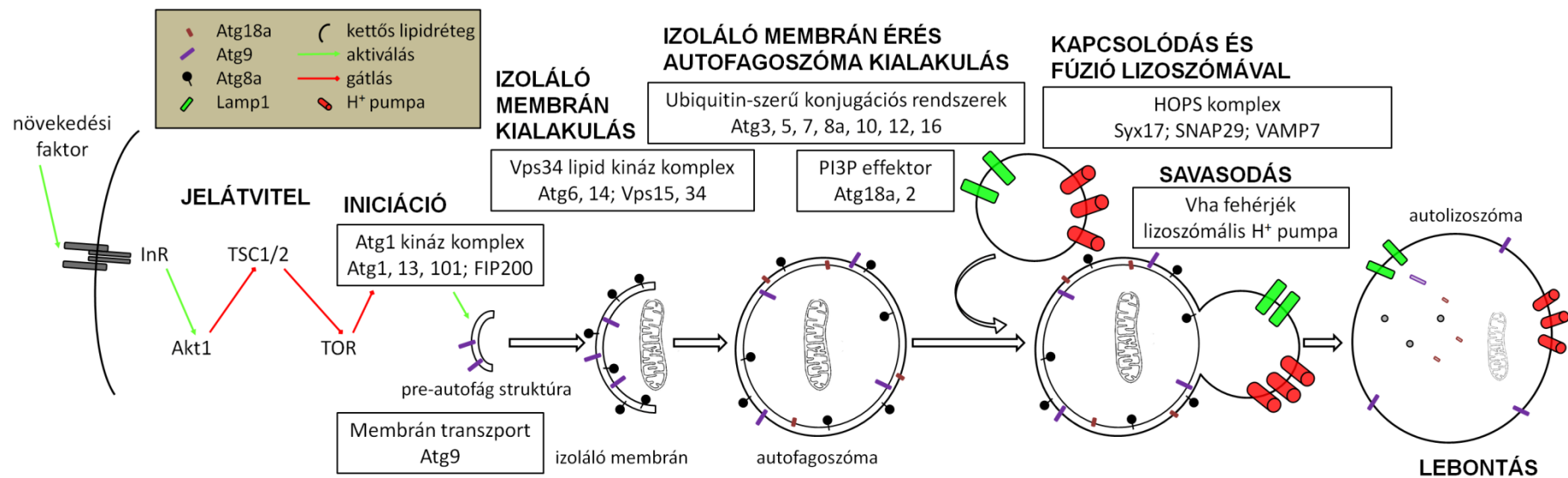
Két ubiquitin-szerű konjugációs rendszer játszik szerepet az izoláló membrán kialakításában (**3. ábra**). A két ubiquitin-szerű fehérje az Atg8 (emlősben egyik homológia

az LC3) és az Atg12, amelyek az ubiquitinációhoz hasonlóan E1-, E2- és E3-szerű enzimek révén módosulnak (ld. 2.2.1. fejezet). Az Atg12-t aktiválja az Atg7 E1-szerű fehérje, majd átkerül az Atg10 E2-szerű konjugáló enzimre, végül az Atg5-höz kapcsolódik kovalensen. Az utolsó lépés irreverzibilis és nem szükséges hozzá specifikus E3 ligáz. Az Atg5 köt az Atg16 fehérjéhez, aminek homo-oligomerizációjával Atg12-Atg5-Atg16 multimer komplexek alakulnak ki.

Az Atg8 prekursor formájában szintetizálódik, amiről az Atg4 cisztein proteáz lehasítja a C-terminális aminosava(ka)t, így az érett Atg8 C-terminális glicinjével tioészter kötést alkot az Atg7 E1-szerű fehérje, majd az Atg3 E2-szerű fehérjére kerül át. Végül az Atg12-Atg5-Atg16 komplex E3-szerű aktivitása az Atg8-at foszfatidil-etanolaminhoz (PE) kapcsolja amid kötéssel (nem pedig fehérjéhez mint az ubiquitin esetén). Az Atg8-PE a fagofór és autofagoszóma külső és belső membránhoz horgonyzódik a foszfatidil-etanolamin farokkal. A citoszolikus formát Atg8-I-nek, a lipidált, membránköttet Atg8-II-nek is nevezik. A fagofór végeinek fúziójával létrejön az autofagoszóma, amelynek felszínéről az Atg4 lehasítja az Atg8-at, ilyenkor tud a lizoszómával egyesülni (Geng és Klionsky, 2008; Chen és Klionsky, 2011).

2.1.1.4. Autolizoszóma kialakulás és lebontás

Az autofagoszómák érésen mennek keresztül (**3. ábra**), amely során a külső membránra Syx17 fehérje toborzódik. Kutatócsoportunk mutatta ki, hogy három SNARE fehérje (Syx17, SNAP29 és VAMP7) által alkotott komplex szükséges az autofagoszóma késői endoszómával és lizoszómával való fúziójához *Drosophilában* (Takats és mtsai, 2013), emlős sejtkéhez hasonlóan (Itakura és mtsai, 2012). Publikálás alatt levő eredményeink alapján a folyamatban részt vesznek a HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) komplex tagjai is. A vakuoláris proton transzporter alegységei, a Vha fehérjék felelősek a lizoszóma savasodásáért, az aktív savas hidrolázok pedig lebontják az autolizoszóma tartalmát a belső membránnal együtt. Végül membrán transzporterek (permeázok) segítségével a felszabaduló monomerek a citoplazmába kerülnek, amelyeket a sejt újra felhasználhat a felépítő folyamatokban.



3. ábra Az autofágia folyamatának fő lépései. Az inzulin jelátvitelen érkező jel aktiválja a TOR kinázt és rajta keresztül gátolja az autofágiát. Éhezés esetén azonban az Atg1 kináz komplex felszabadul a TOR gátlása alól, így indukálódik az autofágia. Az Atg9 a membrán transzportban játszik szerepet. A Vps34 lipid kináz komplex az izoláló membrán kialakuláshoz, míg az ubiquitin-szerű konjugációs rendszerek a membrán növekedéséhez szükségesek a PI3P effektor komplexel együtt. Az izoláló membrán végeinek fúziójával létrejön az autofagoszóma. A lizoszóma savasodásáért a Vha proton pumpa fehérjék felelősek. A HOPS komplex (Car, Dor, Vps11, Vps16a, Vps39, Lt) az autofagoszóma és lizoszóma összeolvadását segíti, így kialakul az autolizoszóma ahol a lebontás történik (Nagy Péter ábrája).

2.1.2. Az autofágia fiziológiás és patológias jelentősége

Az autofágia szerepét mára egyre több fiziológiás folyamatban és betegségben írták le. Fő feladatait néhány nagy csoportra oszthatjuk: minőség ellenőrzés, éhezés esetén anyag- és energiaellátás, sejt és szövet átalakulás (remodeling), valamint sejtszintű védekezés a patogének ellen és immunitás. Tehát a autofágiának alapvetően citoprotektív szerepe van, de túl nagy és túl alacsony szintje is káros, sejthalálhoz vezethet. A sejt homeodinamikájának fenntartásához folyamatos alapszintű autofágia kell, azonban szükség esetén indukálódhat, amit a szigorú szabályozás tesz lehetővé (Mizushima és mtsai, 2008).

2.1.2.1. Minőség ellenőrzés

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer mellett az alapszintű autofágia is részt vesz a sejten belüli minőség ellenőrzésben a felesleges, előregedett vagy sérült makromolekulák és sejtorganellumok (peroxiszómák, mitokondriumok, riboszómák, sejtmagdarabok, ER) lebontásával. Erre bizonyíték, hogy Atg mutáns muslicában vagy egérben fehérje aggregátumok és sérült sejtalkotók halmozódnak fel (Simonsen és mtsai, 2008; Juhasz és mtsai, 2007; Hara és mtsai, 2006; Komatsu és mtsai, 2006). Ezek az aggregátumok ubiquitinált fehérjéket tartalmaznak és normális esetben autofágiával bomlanak le. Ennek a folyamatnak egyik kulcs fehérjeje a p62 (sequestosome 1/SQSTM-1/Ref2P) szelektív autofágia receptor. Atípusos protein kináz C kötő fehérjeként írták le először, amelyhez PB1 doménjével kötődik. A LIR (LC3 interacting region) konszenzus szekvencián keresztül az Atg8-at köti, míg az C-terminális UBA (ubiquitin-associated) domén segítségével a citoszolikus ubiquitinált fehérjéket, aggregátumokat, így azokat autofág lebontásra irányítja, és közben a p62 is lebomlik. Az autofágia gátlásakor a p62 is felhalmozódik (Nezis és mtsai, 2008; Komatsu és mtsai, 2007; Moscat és Diaz-Meco, 2012). A p62-höz hasonló doménszerkezetű és funkciójú fehérje még többek között az NBR1 (Kirkin és mtsai, 2009). A bazális autofágia hiányában főleg a terminálisan differenciálódott sejtek, mint a neuronok károsodnak, feltehetően konformációs betegségek is könnyebben alakulhatnak ki (Huntington-, Parkinson-, Alzheimer-kór, stb.). Azt is megfigyelték, hogy az autofágia indukció lassítja az ilyen betegségek előrehaladását, tehát a normál autofágia citoprotektív, míg a károsodott lebontás neurodegenerációhoz vezet (Jaeger és Wyss-Coray, 2009; Wong és Cuervo, 2010; Ravikumar és mtsai, 2004). A nem

megfelelő autofág lebontás másik következménye a tumorképződés lehet. Számos különböző humán tumorban leírták Atg gének, például a Beclin1 (emlős Atg6) monoallélikus delécióját. Az autofágia egyrészt tumor szupresszor folyamat, mivel a károsodott sejtalkotók eltávolításával csökkenti a kromoszóma instabilitást, másrészt viszont a növekvő tumor túlélését segíti az anyag- és energiaellátással (Mizushima és mtsai, 2008).

A mitokondrium szelektív lebontása is autofágival történik (mitofágia). A károsodott mitokondrium felszínén a PINK1 stabilizálódik, majd megköti a Parkin fehérjét és foszforilálja azt. A Parkin egy E3 ubiquitin-ligáz, ubiquitinálja a mitokondrium külső fehérjeit (Sarraf és mtsai, 2013), így a mitokondrium szelektív autofág lebontását segíti elő. A PINK1 (PTEN-induced putative kinase protein 1) és a Parkin mutációja összefügg a Parkinson-kór kialakulásával. Tünete a sérült mitokondriumok felhalmozódása, ami oxidatív stresszt és neuronpusztulást okoz, főleg a substantia nigrában (Youle és Narendra, 2011).

2.1.2.2. A sejt anyag- és energiellátása

Az autofágia másik jól ismert funkciója a sejt tápanyaggal való ellátása éhezéskor (Scott és mtsai, 2004). A sejtekben bármilyen esszenciális növekedési jel vagy alapanyag hiánya nagymértékű autofágiát indukál, így a túlélés jelentősen megnő. A tápanyaghiány jelenthet aminosav, növekedési faktor, oxigén vagy cukor megvonást. Élesztőben a nitrogénhiány, emlős sejtenyészetekben a teljes aminosav-megvonás igen hatásos (Mizushima és Komatsu, 2011). Az autofágia szerepe tehát, hogy a változó külső források ellenére a sejtben közel állandó szinten tartsa a hozzáférhető alapanyagokat. A lebontás után felszabaduló aminosavak és köztestermékek a bioszintetikus utakat táplálják, a citromsav cikluson keresztül hozzájárulnak az ATP termeléshez, valamint részt vesznek a glükoneogenezisben is (Melendez és Neufeld, 2008). Az aminosavakból szintetizált új fehérjék az éhezéshoz való alkalmazkodásban elengedhetetlenek.

2.1.2.3. Sejt és szövet átrendeződés

A fejlődés és differenciáció során számos alkalommal szükség van szövet vagy sejt átrendeződésre, amely autofágiával valósul meg. A meglévő, de felesleges anyagokat a sejt lebontja, a felszabaduló monomereket pedig a felépítő folyamatokban használja fel. Az autofágia szükséges például a *Sacharomyces cerevisiae* spóra képzéséhez (Tsukada és

Ohsumi, 1993), *Caenorhabditis elegans* dauer formáláshoz (Melendez és mtsai, 2003), *Drosophila melanogaster* metamorfózisához (Juhász és mtsai, 2003; Scott és mtsai, 2004). Atg mutáns állatokban ezek a folyamatok nem megfelelően mennek végbe. Ezekben az időszakokban az állat nem táplálkozik, tehát részben az éhezés indíthatja be az autofágiát (Mizushima és Komatsu, 2011). Emlősökben az első ilyen éhezési periódus közvetlenül a megtermékenyítés után figyelhető meg (Tsukamoto és mtsai, 2008), aminek hatására az autofágia aktiválódik és nagymértékű átrendeződés megy végbe. A születést követő órákban a placentális táplálás megszűnése miatt szintén tápanyaghiány lép fel, az autofágia mutáns egerek röviddel a születés után elpusztulnak (Kuma és mtsai, 2004). Az életkor előrehaladtával az autofágia aktivitása lecsökken. Ennek tudható be részben a károsodott fehérjék és sejtalkotók felhalmozódása, különösen a differenciált, már nem osztódó sejtekben, mint a neuronok és a szívizomsejtek. Ismert, hogy a kalorikus restriktió, azaz a csökkentett kalória bevitel lassítja az öregedést, feltehetőleg az inzulin szint csökkentésén keresztül indukált autofágiával.

2.1.2.4. Védelem a patogének ellen, immunitás

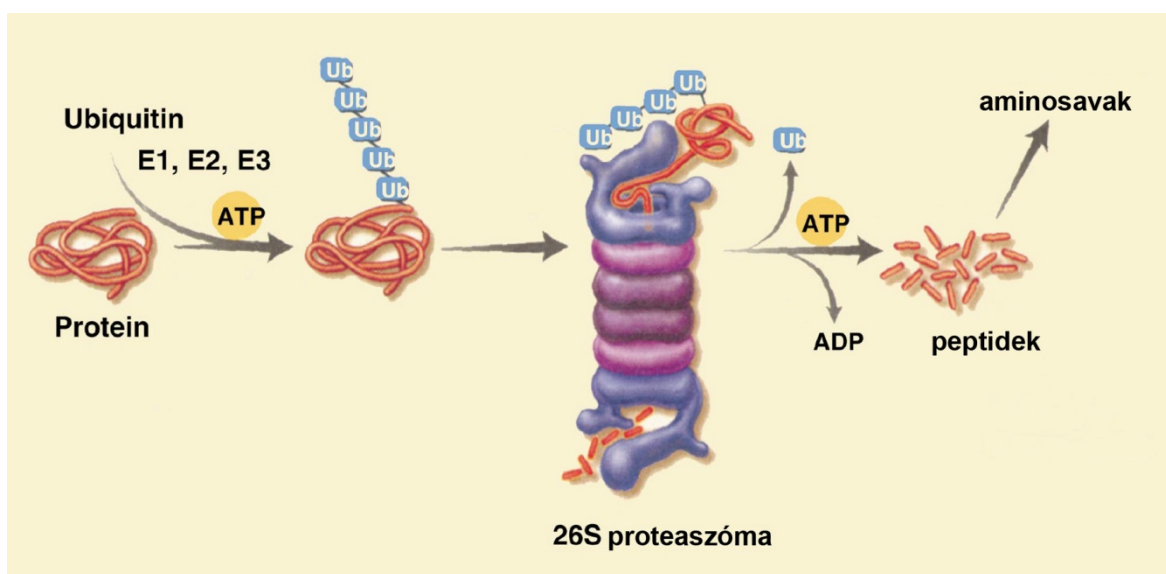
Az intracelluláris patogének elleni védekezésben is szerepet játszik az autofágia (xenofágia) a sejtbe bejutó baktériumok, vírusok vagy paraziták bekebelezésével és lebontásával (pl. *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*). Ugyanakkor bizonyos baktériumok mégis ki tudják védeni a degradációt és az autofág vakuólát osztódásra használják (pl. *Legionella pneumophila*, egér hepatitis vírus) (Mizushima, 2007).

A patogének direkt lebontása mellett az autofágia részt vesz az antigén prezentáció folyamatában is. Az exogén antigének a hivatásos antigénprezentáló sejtekbe jutnak endocitózissal vagy pinocitózissal, majd az endo/lizoszómában degradálódnak. A limitált proteolízissal keletkező antigének kötődnek az MHCII-höz (major histocompatibility complex class II), majd a komplex a sejtfelszínre kerül. Ezt a peptid-MHCII komplexet ismerik fel a helper T-sejtek, így aktiválódik az adaptív immunválasz. Emellett azonban az MHCII-n bemutatott peptidek egy része endogén eredetű. A citoszolikus fehérjéket az autofagoszóma szállítja a késői endoszómához vagy lizoszómához, majd az antigén MHCII-höz kötődve a sejt felszínén bemutatódik (Schmid és mtsai, 2007). Ennek az útvonalnak jelentős szerepe van a virális antigének, valamint autoantigének és tumorsejtek saját-antigén bemutatásában. Újabban leírták, hogy bizonyos körülmények között az autofágia az MHCI-en való antigén bemutatásban is részt vesz (Gannage és Munz, 2010).

2.2. Az ubiquitin-proteaszóma rendszer

Az ubiquitin proteaszóma rendszer (ubiquitin proteasome system – UPS) a lizoszómális rendszer mellett a legfontosabb szabályozott fehérje lebontó útvonal az eukarióta sejtekben. Számos fiziológias és patológias folyamatot szabályoz a rövid féléletű, rendellenes vagy feleslegessé vált fehérjék lebontásával. A fehérjét az ubiquitin molekula jelöli ki lebontásra, és “küldi” a proteaszómához degradációra (4. ábra). Az UPS a gyors és pontos lebontás révén kulcsszerepet játszik a DNS javítás, a sejtciklus, a transzkripció, bizonyos jelátviteli utak, az immunválasz és az apoptózis szabályozásában.

A terület jelentőségét mutatja, hogy az ubiquitin közvetített fehérje lebontás felfedezéséért 2004-ben kémiai Nobel-díjat kapott Aaron Ciechanover, Irwin Rose és a magyar származású Avram Herszko.

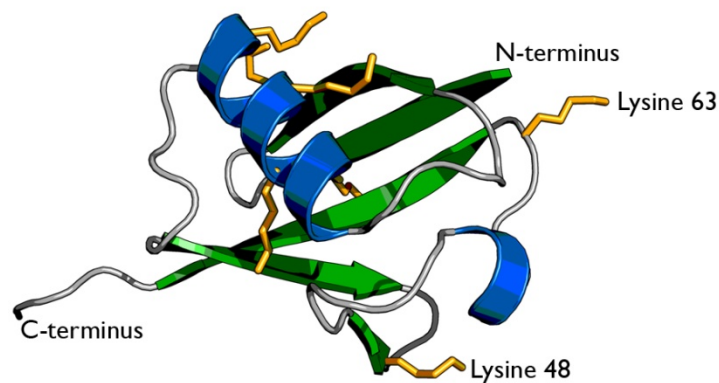


4. ábra Az ubiquitin-proteaszóma rendszer működése. A lebontandó fehérjét egy három tagból álló enzimszisztéma poliubiquitinálja (E1, E2 és E3). A proteaszóma felismeri a poliubiquitin láncot, lebontja a fehérjét, majd a keletkező aminosavakat a szervezet újrahasznosíthatja. (Kisselev és Goldberg, 2001 után módosítva)

2.2.1. Az ubiquitin és az ubiquitin-konjugáció

A poliubiquitináció folyamata során több ubiquitin molekula kapcsolódik kovalensen a lebontandó szubsztráthoz. Az ubiquitin egy 76 aminosavból álló, 8,6 kDa

tömegű globuláris fehérje (**5. ábra**), amely nagymértékben konzervált az élesztőtől az emlősökig, és minden sejtípusban előfordul (latinul ubiquitaer – mindenütt előforduló). Több gén kódolja. Inaktív poliubiquitin prekuzorként vagy egy kópiában egy riboszómális fehérjéhez kapcsolódva szintetizálódik. Ezt követően hasítással aktiválódik. Leggyakrabban a C-terminális glicinjével kapcsolódik a szubsztrát egyik lizinének ϵ -amino csoportjához izopeptid kötéssel, de kialakíthat kötést az N-terminális α -amino csoporttal is.

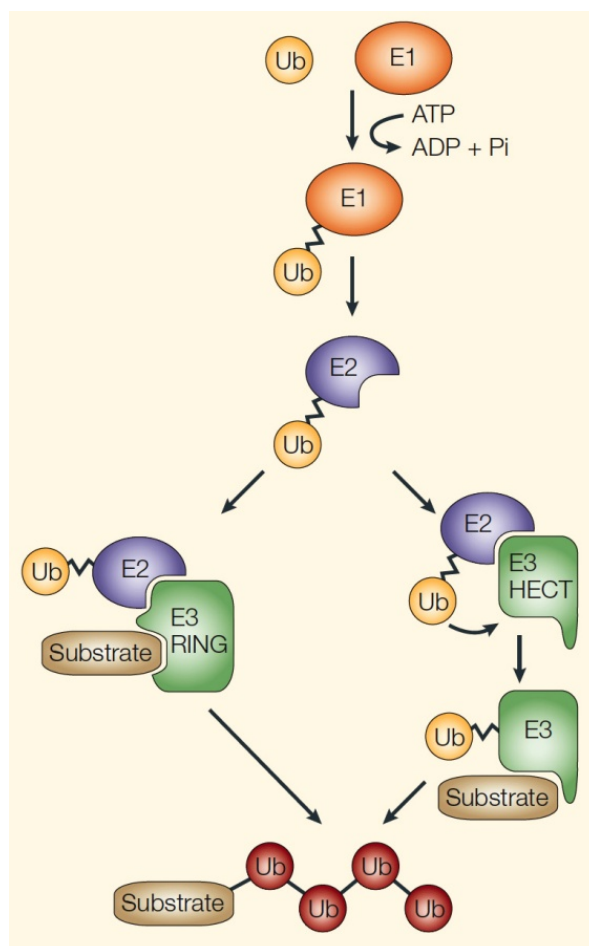


5. ábra A humán ubiquitin térszerkezete, a globuláris fehérje másodlagos szerkezetét ábrázolva. Az α -hélix kék, a β -redő zöld színnel van jelölve. A hét lizin oldallánc sárgával lett kiemelve, közülük a leggyakrabban a 48-as és a 63-as ubiquitiniládódik (<http://commons.wikimedia.org>).

Az ubiquitin-konjugáció folyamatában három enzim vesz részt (Hershko és Ciechanover, 1998; **6. ábra**). Az első lépésben az E1 ubiquitin aktiváló enzim ATP felhasználásával az ubiquitin ciszteinjéhez kapcsolódik nagyenergiájú tioészter kötéssel, így aktiválja azt. Ezután az ubiquitin átkerül az E2 ubiquitin-konjugáló enzim aktív ciszteinjére, majd az E3 ubiquitin-protein ligáz segítségével a degradációra szánt fehérje egyik lizinjére jut át. Az E3 enzimeknek két fő típusa van: a HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) és a RING (Really Interesting New Gene) domén típusú. Az előbbire jellemző, hogy ideiglenesen tioészter kötéssel köti az aktivált ubiquitint, míg az utóbbi az E2-ről közvetlenül a szubsztrátra juttatja azt. Az ubiquitinben található hét lizin maga is tud ubiquitiniládni (Lys6, 11, 27, 29, 33, 48, 63), így alakulhat ki a poliubiquitin lánc. Leggyakrabban a Lys48-on (ritkábban a Lys11-en és 29-en) négy vagy több ubiquitinből álló láncot ismeri fel a proteaszóma. A Lys63 poliubiquitinációja különböző

jelátviteli és transzport folyamatokat szabályoz, vagy makroautofág lebontásra küldi a szubsztrátot (Wong és Cuervo, 2010).

A monoubiquitináció reverzibilis poszttranszlációs módosítás, nem degradációs szignálként szolgál, hanem a fehérje működésének módosítása a feladata (transzkripció, hiszton-funkció, DNS javítás, membrán-transzport, stb.) (Hicke, 2001).



6. ábra Az ubiquitin-konjugáció. Három enzim (E1 – ubiquitin aktiváló enzim, E2 – ubiquitin-konjugáló enzim, E3 – ubiquitin-protein ligáz) segítségével kerül rá a lebontandó fehérjére az ubiquitin jel. Az E3 enzimnek két fő típusa van (HECT és RING domén típusú), amelyek az ubiquitin átadásának módjában különböznek. Az ubiquitin egyik lizinjén keresztül hasonló módon tovább ubiquitinálódhat, így poliubiquitin lánc alakul ki (Di Fiore és mtsai, 2003).

Az E1 enzimből egyféle van, az E2-ből fajtól függően 10-30 féle, míg az E3-ből több ezer, mivel ez biztosítja a szubsztrát specificitást. Az E3 enzim egy degradációs szignált (degron) ismer fel a lebontandó fehérje szekvenciájában. A degron általában poszt-transzkripció módosítás során jön létre. Ilyen az N-terminálison található N-degron,

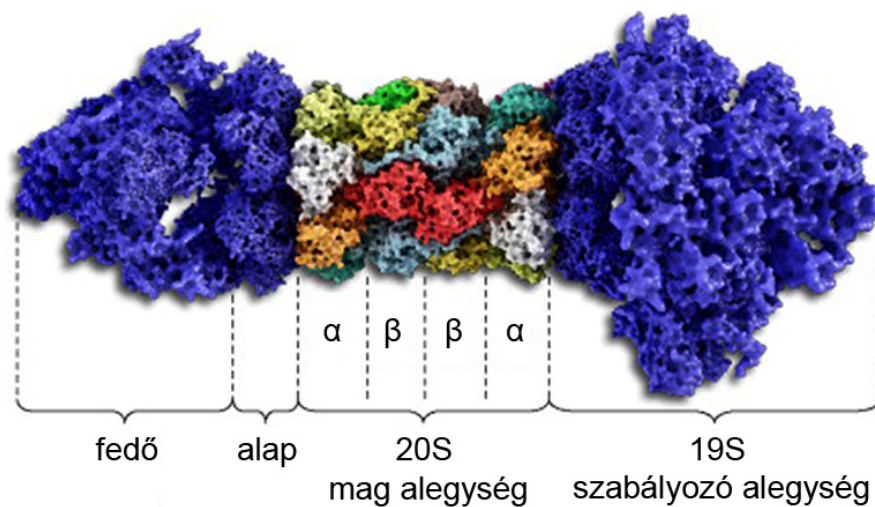
amely lehet bázikus vagy hidrofób destabilizáló oldallánc. A foszfodegron specifikus foszforilált Ser vagy Thr aminosavat tartalmazó fehérje, amit az SCF típusú (Skp, Cullin, F-box containing) E3 ligáz ismer fel. Az említetteken kívül a degron lehet prolin-hidroxiláció, glikoziláció és más, ubiquitin-szerű fehérje kapcsolódása is (Ravid és Hochstrasser, 2008).

2.2.2. A proteaszóma felépítése

Az 1960-as évek végén tettek először említést cylinder alakú proteáz aktivitású komplexről, amit később proteaszómának neveztek el (Arrigo és mtsai, 1988). A proteaszóma egy nagymértékben konzervált, sok alegységes ATP-függő multikatalikus proteáz. A 2,5 MDa-os komplex (26S) egy központi katalitikusan aktív mag alegységből (20S) és egy vagy két szabályozó alegységből (19S) áll (Baumeister és mtsai, 1998) (**7. ábra**). A máig használatos elnevezés a szukróz sűrűséggradiens centrifugálással meghatározott szedimentációs állandón (S) alapul, habár mára kiderült, hogy ez a megnevezés nem pontos. A 20S hordó alakú mag 15nm hosszú és 11nm átmérőjű, négy gyűrűből épül fel. A két szélső hét α alegységből, a két belső hét β alegységből áll. Az alegységek szekezete hasonló, de nem egyezik meg. Az α gyűrű lezárja a bejáratot amíg a 19S alegység nem kapcsolódik hozzá, így megakadályozza, hogy a le nem tekert fehérjék bejussanak. A hordó központi csatornája három üreggé szélesedik ki. A két szélén előüregek, közöttük pedig a központi üreg található. A központi üregben helyezkedik el 2x3 katalitikusan aktív β alegység ($\beta 1$, $\beta 2$ és $\beta 5$), amelyeknek N-terminális treoninjai, a szomszédjukban levő β alegységek által kialakított aktív zsebekkel sorban kaspáz-, tripszin- és kimotripszin-szerű hidroláz aktivitást mutatnak. Azaz, az N-terminális nukleofil hidrolázok csoportjába tartoznak. A keletkező peptideket a citoplazmában oligopeptidázok és aminopeptidázok aminosavakra bontják, amit a sejt újrahasznosíthat (Sorokin és mtsai, 2009). Magasabbrendűekben az adaptív immunitásban szerepet játszó immuno- és thimoproteaszóma alternatív katalitikus β alegységeket tartalmaz ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, illetve $\beta 5t$) (Tanaka, 1994; Hisamatsu és mtsai, 1996; Tomaru és mtsai, 2009).

A 19S komplex 19 alegységből, valamint két részből áll (fedő és alap), ATP jelenlétében kapcsolódik a maghoz. Az alapot hat különböző AAA-típusú ATP-áz (Rpt1-Rpt6, Regulatory particle triple-A protein) és négy ATPáz aktivitást nem mutató alegység alkotja (Rpn1, Rpn2, Rpn10 és Rpn13, Regulatory particle non ATP-ase). A fedő kilenc

Rpn alegységből áll (Rpn3, 5 – 9, 11, 12 és 15). A szabályozó alegység feladata a poliubiquitin lánc felismerése, megkötése, lehasítása, majd a fehérje denaturálása és továbbítása a belső üregbe degradációra. Az Rpn10 és 13 ubiquitin receptorként funkcionál. A metalloizopeptidáz Rpn11 lehasítja a poliubiquitin láncot. A deubiquitináló enzimek (DUBs) tovább bontják a poliubiquitin láncot, így az ubiquitin újrahasznosítható. Az alap Rpt fehérjéi tekerik le a szubsztrátot, az Rpt2 és 5 feladata a zárt α gyűrű kinyitása. A 19S komplex mellett a 20S magot alternatív komplexek is aktiválhatják, mint a PA28 és a PA200 (Tanaka és mtsai, 2012).



7. ábra A 26S proteaszóma felépítése. A 26S proteaszóma egy 20S magból és egy vagy két 19S szabályozó alegységből épül fel. A hordó alakú magot négy gyűrű alkotja. A két külső hét α alegységből, a két belső hét β alegységből áll. A 19S komplex alap és fedő alkomplexre osztható, amelyek Rpn és Rpt fehérjékből állnak. (Jung és Grune, 2012 után módosítva)

2.2.3. Az UPS fiziológias és patológias szerepe

Az UPS egyik feladata az előregegett, rosszul feltekeredett vagy hibás fehérjék lebontása, azaz a minőség ellenőrzés, ami a citoplazma mellett a sejtmagban és az endoplazmatikus retikulumban történik. A lebontás károsodása a sejtmagban a genetikai állomány és a transzkripció megváltozásához vezet. Az újonnan szintetizálódott fehérjék minőség-ellenőrzése az endoplazmatikus retikulumban történik. A hibásan feltekert vagy összeszerelődött fehérjék az ERAD (ER-associated protein degradation) útján bomlanak le.

Az ER membránján lévő póruson át kijutnak a citoplazmába, ahol a membrán-asszociált E3 ubiquitilálja, majd a proteaszóma lebontja. Az UPS gátlása a rosszul feltekert fehérjék felhalmozódásához vezet, protein konformációs betegségek kialakulását okozhatja (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, stb.). Ezt az a régi felismerés is alátámaszthatja, hogy neurodegenerációs betegségek esetén a citoplazmás aggregátumok ubiquitinált fehérjéket tartalmaznak (Mori és mtsai, 1987). Máig tisztázatlan kérdés, hogy az UPS károsodás közvetlen kiváltója a neurodegeneratív betegségeknek vagy a betegség következménye a hibás lebontás (Cook és Petrucelli, 2009).

Az UPS másik funkciója a rövid féléletű szabályozó fehérjék eltávolítása, így a különböző fehérjék egymás után, meghatározott sorrendben fejthetik ki hatásukat, gyors választ kialakítva. Ezek közül részletezem a legfontosabbakat a következőkben.

Eukariótákban a sejtciklus folyamatát ciklinek szigorúan kontrollált periodikus termelése és lebontása szabályozza, amelyek a ciklin dependens kinázokat (CDK) aktiválják, így a sejtciklus során pontosan meghatározott sorrendben és időben működhetnek. Az egyirányú folyamat fenntartásához a szabályozó fehérjék gyors lebontása szükséges, amit az UPS valósít meg. A ciklinek, CDK inhibitorok (p21, p27, p19) és aktivátorok (CDC25 foszfatáz család) az UPS által bomlanak le. Két típusú E3 ubiquitin-protein ligáz vesz részt ebben: az SCF komplex a ciklinek és ciklin-dependens kinázok lebontásában, az APC (anaphase promoting complex) pedig a metafázis-anafázis átmenetben és a mitózis lezárásában játszik szerepet (Reed, 2006).

A génexpresszió szabályozásának több szintjén is (transzkripció, poszt-transzkripció és transzláció) fontos szerepe van az UPS-nek, proteolitikus és nem proteolitikus módon egyaránt. Részt vesz transzkripciós faktorok, inhibitorok, ko-aktivátorok lebontásában, kromatin módosításban, az iniciáció, elongáció és termináció szabályozásában is. Regulált UPS-függő hasítás aktiválja például az NF κ B fehérjecsald tagjait. A 19S proteaszóma alegységek, különösen az ATP-ázok, a chaperon és DNS-helikáz aktivitásuk miatt játszanak szerepet a transzkripcióban protein folding és protein-DNS kapcsolatok szabályozásával. Poszt-transzkripciósan az mRNS stabilitását szabályozza az UPS: az RNázok aktivitását változtathatja, és az mRNS-kötő proteineket bonthatja. Transzláció során az UPS iniciációs faktorokat (eIF3a és eIF4G) bonthat, ezzel a riboszómális preiniciációs komplex összeszerelődését gátolja, így szelektív fehérje szintézist tesz lehetővé (Konstantinova és mtsai, 2008; Hammond-Martel és mtsai, 2012; Yao és Ndoja, 2012).

Az apoptózis szabályozásában igen összetett szerepe van az UPS-nek: indukálhatja és gátolhatja is azt a környezettől, sejttípustól és a sejt proliferatív állapotától függően. Az UPS pro-apoptotikus funkcióját például az IAP (inhibitor of apoptosis proteins) anti-apoptotikus fehérjék lebontásával éri el, vagy a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje degradációjával a TNF- α -indukált apoptózis során. Anti-apoptotikus szerepét például a celluláris stressz hatására foszforilálódott I κ B α molekula lebontásával fejt ki, így a szabad NF- κ B transzkripciós faktor a sejtmagba jutva anti-apoptotikus fehérjék, növekedési faktorok és egyéb fehérjék transzkripcióját indítja el, ezzel megvédi a sejtet a sejthaláltól. A p53 tumorszuppresszort is folyamatosan lebontja a proteaszóma. DNS károsodás hatására a lebontás gátlódik, a p53 felhalmozódik, leállítja a sejtciklust, és végül apoptózist indukálhat. Tehát a pro- és anti-apoptotikus fehérjék pontos és szigorú lebontásával az UPS egyensúlyt teremt a túlélés és sejthalál között (Konstantinova és mtsai, 2008; Naujokat és Hoffmann, 2002).

Az immunoproteaszóma felelős az intracelluláris fehérjék hasításáért az MHCI (major histocompatibility complex class I) számára az antigénprezentáció citoplazmatikus útjában, így a celluláris immunválasz fontos szereplője magasabbrendűekben. IFN γ (interferon γ) termelés hatására (pl. vírusfertőzés esetén) megnő az immunoproteaszóma specifikus alegységek expressziója: LMP2 (β 1i), MECL-1 (β 2i) és LMP7 (β 5i) (Tanaka, 1994; Hisamatsu és mtsai, 1996). Az alternatív katalitikus alegységek miatt megváltozik a proteaszóma specificitása, a hasítás eredményeképp bázikus vagy hidrofób C-terminálisú peptidek keletkeznek, amelyeket az ER membránjában ülő TAP (Transporter Associated with antigen Processing) szállító molekulák nagy affinitással megkötnék és bejuttatnak az ER üregébe, ahol a peptid az MHCI-hez kapcsolódik. A Golgi készüléken keresztül a sejtfelszínre jutó MHCI-peptid komplexet ismeri fel a citotoxikus T-limfociták membránjában található TCR (T Cell Receptor), így celluláris immunválasz indulhat el a tumorantigéneket vagy idegen fehérjéket (pl. virális antigéneket) prezentáló sejtek ellen (Tanaka és mtsai, 2012). Újabb kutatások szerint az immunoproteaszóma számos más folyamatban is fontos szerepet játszik (Groettrup és mtsai, 2010). A β 1i és β 2i mellett β 5t alegységet tartalmazó proteaszómát thimoproteaszómának nevezzük, mivel csak a csecsemőmirigyben mutatták ki jelenlétét. A CD8+ citotoxikus T-limfociták érésében, pozitív szelekciójában játszik szerepet (Murata és mtsai, 2007).

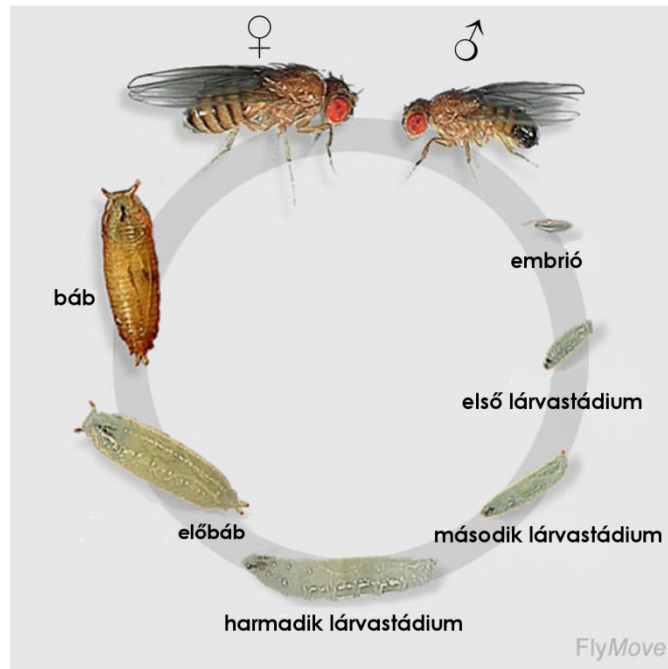
Az UPS közvetített degradáció szabályozza a transzkripciós választ hipoxia során. Jó oxigénellátottság esetén a Hif1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) transzkripciós faktort

gyorsan lebontja a proteaszóma. Ehhez szükség van egy többalegységes E3 ligázra, amelynek a szubsztrát-felismerő tagja a Vhl (von Hippel-Lindau) tumorszupresszor fehérje. A Vhl az ODD (oxigen dependent degradation) doménhez köt a Hif1 α -n (Huang és mtsai, 1998). Normál oxigénszint esetén egy prolin hidroxiláz hidroxilálja a Hif1 α 402. és/vagy 564. prolin oldalláncát (Ivan és mtsai, 2001), így a Vhl felismeri, ubiquitinálja, majd a proteaszóma lebontja. Ha alacsony az oxigénszint, a Hif1 α stabilizálódik és a Hif1 β -val aktív Hif1 heterodimert képez, amely a HRE (hipoxia responsive element) konszenzus szekvenciához kötődik, és számos gén transzkripcióját aktiválja. Így szabályozódik az eritropoézis, angiogenezis, sejtciklus, glükóz metabolizmus és apoptózis (Ke és Costa, 2006). A VHL mutációja okozza a dominánsan öröklődő von Hippel–Lindau betegséget, amely nagymértékben hajlamosít tumorok kialakulására. Jellemző a hipoxia szabályozása alatt álló gének túltermelése, mint a VEGF (vascular endothelial growth factor), így a véredények abnormális burjánzása indul meg.

2.3. Az ecetmuslica, mint modellállat

A ecetmuslicát (*Drosophila melanogaster*) Thomas H. Morgan XX. század elején végzett kísérletei óta használják biológiai kutatásokhoz, mint modellállatot. Az előnyös tulajdonságai mindmáig ugyanazok: kis testméret, gyors fejlődés, rövid életciklus, könnyű tenyésztetőség, alacsony fenntartási költség.

Az ecetmuslica a rovarok között a kétszárnyúak rendjébe (*Diptera*), ezen belül a *Drosophila* nemzetségbe és *Sophophora* alnemzetségébe tartozik. Teljes átalakulással (holometamorfózissal) fejlődik. A nőstény a párzás után szinte azonnal megtermékenyített petéket rak le. Laboratórumi körülmények között (25 °C, 60% páratartalom) az embriók 24 órán belül lárvává alakulnak és elkezdenek táplálkozni. Három lárvastádiumon haladnak át, amelyeket vedlés különít el. Az L1 és L2 stádium mintegy 24 óráig, az L3 48 óráig tart. Az L3 stádiumon belül megkülönböztetünk táplálkozó és vándorló periódust. A vándorló lárvát már nem táplálkozik, hanem a bebábozódáshoz megfelelő száraz helyet keres. A nyálmirigy váladékával rögzíti magát, majd előbáb képződik belőle. Ez a peterakás után kb. 120 órával (AEL – After Egg Laying) történik meg. Az előbáb 12 órával később megtörténő vedlése után kialakul a báb, amelyből 4 nap után kel ki a kifejlett állat. Az adultok csak a kikelés után 8-12 órával válnak ivaréretté, így lehetővé válik a szűz nőstények válogatása és célzott keresztezése (**8. ábra**) (Ashburner és mtsai, 2005).



8. ábra A *Drosophila melanogaster* életciklusa. A holometamorfózissal fejlődő ecetmuslica embrió, lárva (L1, L2 és L3) és bábállapoton halad át, majd kikel a kifejlett állat (adult) (<http://flymove.uni-muenster.de> után módosítva).

A *Drosophilát* a rengeteg felhalmozott információ és a genetikai, sejtbiológiai vizsgálómódszerek tárháza teszi alkalmassá alapkutatási célokra. Négy pár kromoszómája van, egy pár ivari kromoszóma (X, Y) és három pár autoszóma (2., 3. és 4.). A 4. kromoszóma olyan kis méretű, hogy szinte elhanyagolható az ezen található gének száma. Az Y kromoszóma egésze heterokromatikus, csak néhány, a hím termékenységért felelős gént tartalmaz. A teljes genom szekvenciája elérhető 2000 óta, a haploid genom mérete 175 Mb és hozzávetőlegesen 15000 gént kódol.

A keresztezések során három fő genetikai eszköz áll rendelkezésünkre: a balanszer kromoszómák, a fenotípusos markerek és hímelekben a rekombináció hiánya. A balanszer kromoszómák többszörös inverziókat tartalmaznak, ami megakadályozza a rekombinációt a homológ kromoszómák között meiózis során; a rekombináns ivarsejtek életképtelenek. Egy vagy több domináns markert (pl. Curly, Tubby, Stubble) és több recesszív markert hordoznak, valamint homozigóta formában rendszerint letálisak. A marker mutációk gyakran a szem, a test színét, a szőrök vagy a szárny alakját befolyásolják. A negyedik kromoszómának nincs balanszere, mivel kis mérete miatt a homológ rekombináció igen ritka. Balanszer kromoszómák segítségével letális mutációk is fenntarthatók törzsben, és a fenotípusos markerek segítségével a keresztezések során más recesszív mutációk

öröklődését is indirekt módon tudjuk követni. A mindennapos munkában az utódok adott csoportjának kiválogatása a jól látható fenotípusos markerek alapján történik.

Az alapvető sejtélettani folyamatok konzerváltak az élőlények között, és az *ecetmuslica* genomjában megtalálható az emberi betegségeket okozó gének kétharmada, így a muslicán végzett kísérletek hozzásegítenek a magasabbrendűek sejtbiológiai folyamatainak megértéséhez. Modellállatként használják neurodegenerációs betegségek (Parkinson, Huntington kór), rák és cukorbetegség kutatásban is.

Az autofágia-kutatásban is kiváló modellállat a *Drosophila*. Az autofágia szabályozása is evolúciósan konzervált a rovarok és emlősök között: például a sejtnövekedési útvonalak, úgymint az inzulin/PI3K és TOR jelátviteli utak aktiválódása gátolja az autofágiát. A növekedési faktorok hiánya, az éhezés, és a TOR kinázt gátló rapamicinnel való kezelés az autofágiát aktiválja. A *Drosophila* másik előnye, hogy a gyorsan növekvő poliploid lárvális szövetek, mint például a mi májunkhoz és fehér zsírszövetünkhöz hasonló funkciót betöltő zsírtest, éhezés hatására (stressz-indukált autofágia) vagy a normális metamorfózis (a lárvális szervek AEL 108 órától kezdődő fiziológiás lebomlása) során megdöbbenő mértékű autofág indukciót mutatnak, mivel ezáltal biztosítják az osztódó és differenciálódó diploid sejtek anyag- és energiaszükségletét, amely az imágó kifejlődésében igen fontos szerepet játszik.

2.4. Genetikai technikák az ecetmuslica kutatásban

A *Drosophila* kiválóan alkalmazható modellállat, mert rengeteg genetikai eszköz és vizsgálati módszer áll rendelkezésünkre, valamint elérhető a teljes genom szekvencia 2000 óta (Adams és mtsai, 2000). A teljes genom vizsgálat és további kísérleteink során felhasználtuk a géncsendesítést és a génexpresszió szabályozását, a következőkben ezeket szeretném röviden bemutatni.

2.4.1. Az UAS-Gal4 rendszer

Az UAS-Gal4 rendszer egy széleskörűen használható eszköz a *Drosophila* kutatásban, amellyel gének expressziója szabályozható célzottan (Brand és Perrimon, 1993). *Saccharomyces cerevisiae*-ben írták le először a Gal4 fehérjét, amely egy 881 aminosav hosszú fehérje, a galaktóz által indukált gének transzkripciós faktora. A

szabályozott gének promóterében található 17 bázispárnai UAS (Upstream Activating Sequence) helyekhez kötődik, így aktiválja a transzkripciójukat. De nem csak élesztőben használható, más élőlények (pl. *Drosophila*) genomjába bevitt transzgénikus Gal4 termeltethető (Fischer és mtsai, 1988), de nincs káros hatása önmagában, mivel *Drosophilában* a Gal4-nek nincs természetes funkciója. Gal4 hiányában az UAS szekvencia mögött álló gén transzkripciósan inaktív marad, így minden következmény nélkül fenntartható transzgénikus törzsben. Ahhoz hogy aktiváljuk a transzkripciót, az UAS törzset keresztezzük az adott expressziós mintázatot mutató promóter szabályozása alatt álló Gal4-et hordozó törzzsel (Gal4 driver). Az utódokban az UAS mögött álló gén átíródik a Gal4 transzkripció mintázatának megfelelően (Elliott és Brand, 2008) (9. ábra).

Ennek a kéttagú rendszernek számos előnye van. Egyik, hogy olyan géntermékeket is vizsgálhatunk, amelyek károsak vagy hatásuk letális, hiszen a Gal4 nélkül inaktívak. A másik, hogy a különböző promóter-Gal4 konstrukciókat keresztezésekkel szabadon kombinálhatjuk bármely UAS-szabályozta génnel. A különböző Gal4 driverek más-más térbeli, időbeli expressziós mintázatot mutatnak (Duffy, 2002). A munkánk során használt Gal4 driver a hs-Gal4, amely egy hőérzékeny (hőshock, hs) promótert tartalmaz; a cg-Gal4, amelyben a promóter zsírtest-specifikus (kollagén, cg) és az act-Gal4, amelyben a minden sejtben folyamatosan működő aktin promóter mögött van a Gal4. Az adott gén funkcióvesztéses fenotípusa is vizsgálható, ha az UAS szekvencia után RNS interferenciát kiváltó transzgén található.

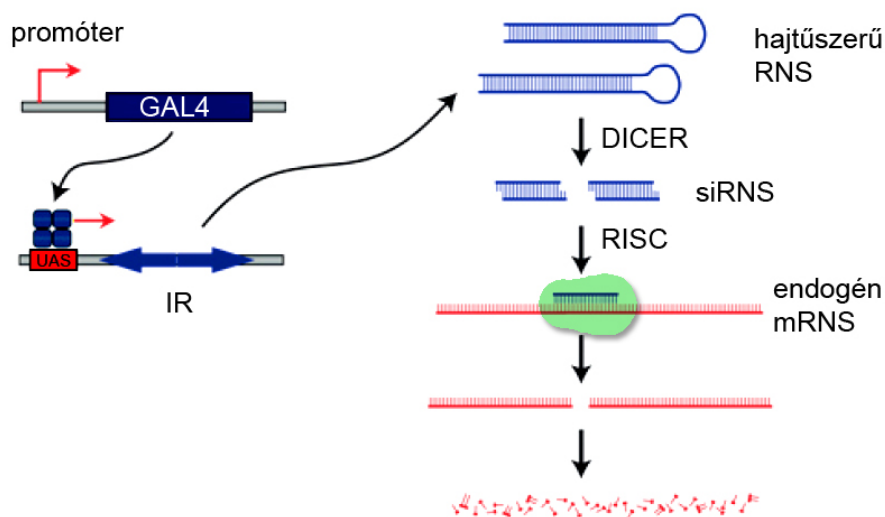
2.4.2. Az RNS interferencia

Az RNS interferenciával (RNSi) történő géncsendesítést először növényekben (Ratcliff és mtsai, 1997), majd *Caenorhabditis elegans*-ban (Fire és mtsai, 1998) írták le. A genom immunrendszerének is nevezik, mivel az idegen eredetű dupla szálú RNS eltávolítása, a transzpozonok féken tartása és a vírusok elleni védekezés a természetes feladata. A folyamat széleskörű tanulmányozása révén mára egy gyakran használt, nagy jelentőségű genetikai eszköz lett. Az RNSi lehetővé tette a reverz genetikai vizsgálatok elterjedését. A szekvencia ismeretében bármely gén funkcióvesztéses fenotípusából következtethetünk a biológiai funkcióra. A vizsgálatok genom szintűvé válhattak amióta elérhetőek a teljes genom szekvenciák és transzgénikus RNSi könyvtárak.

A géncsendesítés lényege, hogy a dsRNS (double stranded RNA - duplaszálú RNS) csökkenten tudja annak a génnek a kifejeződését, amelynek az RNS-e homológ a dsRNS-el, mivel az szekvenciaspecifikus RNS degradációt idéz elő (9. ábra).

A DICER egy ribonukleáz III enzim, amely felismeri és kis siRNS-ekre (small interfering RNA) darabolja fel a hosszú dsRNS-t. *Drosophilában* két gén kódol DICER enzimet, közülük a DICER-2 (Dcr-2) felelős az siRNS prekursorok hasításáért. A siRNS-ek 21-25 nukleotid hosszú dsRNS-ek 2 nukleotidnyi 3' túlnyúló véggel és 5' foszforilációval. Az siRNS egyik szála kötődik a RISC-hez (RNA induced silencing complex). A RISC felismeri az siRNS-sel megegyező szekvenciájú mRNS-t és szekvenciaspecifikusan kötődik hozzá. Az endonukleázok (Argonaute 2) hasítják a target mRNS-t, majd az exonukleázok teljesen lebontják, ami géncsendesítést eredményez.

Törzsközpontokban elérhetőek a szinte teljes genomot lefedő transzgénikus UAS-RNSi *Drosophila* törzsek (Dietzl és mtsai, 2007). A Gal4 forrással történő keresztezés után a transzgénről átíródik az UAS szekvencia mögött található inverted repeat (IR – az adott gén egy részével homológ szekvenciát helyes irányban és fordított elrendezésben tartalmazó szakasz), majd hajtúyszerű duplaszálú RNS képződik, ami aktiválja a géncsendesítést (9. ábra). Emellett ma már elérhetőek mikroRNS alapú csendesítő transzgének is (Ni és mtsai, 2011).



9. ábra A transzgénikus RNS interferencia *Drosophilában*. A transzgénikus UAS-RNSi törzseket Gal4 forrással keresztezve az inverted repeat (IR) átíródik és hajtúszerű RNS-t alkot. A DICER enzim felismeri a duplaszálú RNS-t és feldarabolja siRNS-ekké. A RISC molekulakomplex a komplementer endogén mRNS szekvencia specifikus degradációját irányítja (<http://www.vdrc.at> után módosítva).

2.4.3. Az Flp/FRT rendszer

Drosophilában széleskörűen használt genetikai eszköz az élesztő 2 μ plazmidból származó Flp (flippase) helyspecifikus rekombinááz (Golic és Lindquist, 1989), amely adott DNS szekvenciákat ismer fel és rekombinációt indukál a két DNS szál között. Az enzim az FRT (FLP recombination target) helyekhez köt, amelyet két 13 bp inverted repeat és egy 8 bp spacer szekvencia alkot. Ezáltal egy nagy specifitású, szabályozható rendszer áll rendelkezésünkre, amely az Flp jelenlététől függően lehetőséget nyújt két FRT közötti DNS szekvencia kivágására mitotikus rekombinációval, azaz mozaik állatok létrehozására (Ashburner és mtsai, 2005).

Klonális expressziót alkalmazva lehetővé válik, hogy egy szöveten belül, egymás mellett vizsgáljunk kontroll és RNS interferenciás vagy domináns-negatív mutáns fehérjét expresszáló sejteket. Kísérleteink során erre a célra több, az UAS-Gal4 és az Flp/FRT rendszert is hordozó törzset használtunk (ld. **1. függelék**). Közös bennük, hogy tartalmazzák a hs-Flp; Act>CD2>Gal4 (Scott és mtsai, 2004) transzgént illetve valamilyen fluoreszcens markert (GFP - green fluorescent protein, mCherry). Ha az adott genetikai elrendeződésben expresszálódik a Flp helyspecifikus rekombinááz, az FRT (>) helyeken hasítja a DNS-t, így a CD2 kazetta kivágásával az aktin promóter hatása alá kerül a Gal4 gén, a Gal4 fehérje átíródik, így aktiválja az UAS szabályozása alatt álló transzgén átíródását. Mi egy hősokkpromóter (hs) szabályozása alatt álló Flp gént alkalmaztunk, amely szobahőmérsékleten csak egyes sejtekben, véletlenszerűen aktív, így kontrollként azok a szomszédos sejtek szolgálnak, amelyekben inaktív maradt (**10. ábra**).

2.4.4. Teljes genom vizsgálatok

A genom szűrések klasszikus módja az előre mutató (forward) genetikán alapul. Mutációkat hoznak létre véletlenszerűen, majd a kérdéses fenotípust pontosítják, végül az érdekes mutációkat térképezik és meghatározzák, azaz a megváltozott fenotípushoz keresik a genetikai okot. A módszer hatékonyan alkalmazható, de korlátja, hogy minden esetben meg kell határozni a mutáció által érintett gént, ami igen időigényes lehet. A fordított (reverse) genetikán alapuló genom szűrés ehhez képest előnyt élvez. Az elérhető teljes genom szekvenciák és az RNS interferenciával történő géncsendesítés lehetővé teszi, hogy a funkcióvesztéses fenotípust azonnal az ismert DNS szekvenciához kössük. Az RNS

interferencia szűrés kiváló módszer a gén funkció genom szintű vizsgálatára egyre több modellrendszerben (Mohr és Perrimon, 2011). Számos teljes genomra kiterjedő szisztematikus vizsgálatot végeztek már sejttenyészeteken is (Lipinski és mtsai, 2010), azonban komplex fejlődési folyamatok csak teljes állatban vizsgálhatók (Mummery-Widmer és mtsai, 2009). Erre a célra elérhetőek UAS-Gal4 rendszerrel indukálható, teljes genomot lefedő transzgénikus RNS interferencia *Drosophila melanogaster* törzskönyvtárak, így a gének szövet vagy fejlődési szakasz specifikusan inaktiválhatóak in vivo. A törzskönyvtárakat felhasználva szisztematikusan vizsgálhatjuk a fehérjekódoló gének funkcióját *Drosophila* bármely sejtípusában, bármely fejlődési szakaszban (Dietzl és mtsai, 2007). Az első generációs könyvtárak esetén P-elem alapú transzgének random inszerciója történik. A második generációs könyvtárak készítésekor mindig egy adott inszerciós helyre (landing platform) kerülnek a transzgének phiC31 integráz segítségével, ami szekvenciaspecifikus rekombinációt idéz elő az attP és attB helyek között (Ni és mtsai, 2009), így azonos erősségű lesz az expresszió és a környező gének esetleges overexpressziója sem okoz problémát, ami kevesebb fals negatív eredményt jelent.

3. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az autofágia folyamatáról rengeteg információ áll rendelkezésünkre és napjainkban is erősen kutatott téma, ám máig vannak felderítetlen területei. Kísérleteink célja volt, hogy az autofágia genetikai szabályozását és molekuláris mechanizmusait részletesebben megismerjük. A szűrés során azonosított gének ismeretében határoztuk el, hogy az UPS és az autofágia közti kapcsolatot megvizsgáljuk, és olyan jelátviteli utat keressünk, amely közvetíthet a kettő között.

Munkánk célkitűzései:

1. Új autofágia gének azonosítása egy *Drosophila* lárvák zsírtestében kivitelezett in vivo teljes konzervált genom szűrés segítségével.
2. E nagyszabású munka elvégzés után szintén célul tűztük ki az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az autofágia kapcsolatának vizsgálatát proteaszóma alegység RNSi sejtekben. Megvizsgáljuk a proteaszóma alegység csendesítés proteaszóma aktivitásra, és az autofágiára gyakorolt hatását. Felderítjük a proteaszóma inaktiváció aberráns fehérje felhalmozódásra, autofág lebontásra és apoptózis kialakulására gyakorolt hatását.
3. Kísérleteinkkel a hipoxia jelátvitel és az autofágia kapcsolatát kutatjuk.
4. A proteaszóma károsodás hatására indukálódó autofágia Hif1 α (hipoxia) jelátvitel, p62 és Atg gén függőségének vizsgálata együttes géncsendesítéses kísérletek segítségével.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált törzsek és az állatok tartása

Az ecetmuslicákat 12 órás megvilágítás és 50%-os páratartalom mellett 25 °C-on tartottuk vattadugóval lefedett üveg csövekben. Táplálásuk standard szárított élesztő/kukoricaliszt/agar táptalajjal történt. A kísérletek során felhasznált törzsek listáját az **1. függelék** tartalmazza: törzs név, CG szám, hivatkozás és genotípus/transformant ID. A törzseket a Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Bécs, Ausztria) és a Bloomington Drosophila Stock Center (Bloomington, Indiana, USA) biztosította.

4.2. Proteaszóma aktivitás teszt

A proteaszóma aktivitás vizsgálatához olyan transzgénikus törzset használtunk, amely egy fluoreszcens UPS riportert fejez ki. A GFP-CL1 fúziós fehérjében egy degradációs szignál gyors proteaszómális lebontásra irányítja az amúgy stabil GFP-t, így a fehérje szintje jól jelzi az UPS aktivitását (Pandey és mtsai, 2007).

4.3. Fénymikroszkópos vizsgálatok

Az éheztetéses kezelés során minden esetben jóltápált 72-96 órás L3 stádiumú lárvákat 3 órára 20%-os cukoroldatba helyeztünk. Sztereomikroszkóp alatt kiboncoltuk, majd lefedtük a lárvák zsírtését 0,2 µM DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) sejtmagfesték 50% glicerín/PBS (phosphate buffered saline, 0,01 M) oldatban a transzgénikus riporterek esetén vagy 100 µM LysoTracker Red (Invitrogen) lizoszómális festékkel festettük meg a szöveteket lefedés előtt. A 24 órás chloroquine kezeléshez a lárvákat 60-66 órával AEL 3 mg/ml chloroquine-t (Sigma) tartalmazó friss tápra helyeztük át az autofágia-flux vizsgálatához. A képeket Apotome2 grid konfokális egységgel felszerelt Zeiss Axioimager M2 mikroszkóp Plan-NeoFluar 40x 0.75 NA objektív, AxioCam Mrm kamera és Axiovision szoftver MinMax automatikus kép beállítás segítségével készítettük. A nyers képek feldolgozása Adobe Photoshop programmal történt.

4.4. Immuncitokémia

A kettétépett és kifordított L3 stádiumú lárvákat 3,7% paraformaldehid/PBS oldatban fixáltuk 4°C-on egy éjszakán át. Másnap a mintákat kétszer öblítettük, 2 órán át mostuk PBS-ben, majd 15 percig permeabilizáltuk PBTX-DOC oldatban (0,1% Triton X-100 és 0,05% sodium dextracholate PBS-ben) és 3 órán át blokkoltuk 3% kecske szérummal PBTX-DOC-ban. Ezután a mintákat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át 1% kecske szérummal PBTX-DOC-ban. Következő nap 3x30 percig mostuk PBTX-DOC-ban, majd szobahőmérsékleten 4 órán át inkubáltuk a mintákat a másodlagos ellenanyaggal (1:1500) 1% kecske szérummal PBTX-DOC-ban. Végül, 3x15 perc PBTX-DOC mosás és 1x15 perc PBS mosás után a mintákat szétboncoltuk és lefedtük 0,2 μ M DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) sejtmagfesték 50% glicerin/PBS oldatban.

Felhasznált ellenanyagok és hígításaik: csirke anti-GFP (1:1500, Invitrogen), patkány anti-Atg8a (1:300), nyúl anti-p62 (1:2000; Pircs és mtsai, 2012), nyúl anti-ubiquitin (1:50, Dako), nyúl anti-active caspase3 (1:500, Cell Signaling). Alexa 488 anti-csirke, Alexa 546 anti-nyúl és Alexa 568 anti-patkány (1:1500, Invitrogen) másodlagos ellenanyagok.

4.5. Reverz-transzkriptáz PCR

act-Gal4 driverrel kereszteztük az UAS-RNSi vonalakat, az L3 stádiumú lárvákból teljes RNS-t izoláltunk Purelink RNA Mini Kit-tel (Ambion) a protokoll szerint, majd Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) segítségével cDNS-t szintetizáltattunk a protokoll szerint, végül 25 ciklusos PCR reakciót végeztünk.

PCR reakciónként: 16,375 μ l víz; 2,5 μ l 10x Dream Taq Green puffer; 2,5 μ l dNTP mix (2 mM mindegyikből); 1,5 μ l primer1 és primer2 (10 μ M); 0,125 μ l Dream Taq DNS polimeráz (Fermentas); 0,5 μ l cDNS.

A következő primereket használtuk (a tervezéskor figyeltünk, hogy az exon-exon határokat átfedjék, így megakadályozzuk a genomi DNS véletlen felhalmozódását): TACTCCTCCCGACACAAAGC, CTGGGTCATCTTCTCACGGT (Actin5C), TGGATCGACGCTGATAAAGA, GTCTCCTGAAACGGGCAAT (p62), CTTGGATCGAACTCAGCACA, CAATGTTCCAGCTACTGGGTG (BNIP3).

Belső kontrollként az Actin5C mRNS-re tervezett primereket használtunk, ugyanis az aktin minden sejtben egyenlő mértékben expresszálódik. A PCR-hőprofil a **1. táblázat** mutatja be. A reakciótermékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk meg, a DNS-festéshez etídium-bromidot (10 mg/ml, Sigma) használtunk. A dokumentációt SynGene/Gene Snap rendszerrel végeztük.

		Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)
	Kezdeti denaturáció	95	1:00
25x	Denaturáció	95	0:30
	Anelláció	55	0:30
	Extenzió	72	0:30
	Végső elongáció	72	5:00

1. táblázat A PCR reakció hőprofilja.

4.6. Western blot

hs-Gal4 driverrel kereszteztük az UAS-RNSi vonalakat, a lárvákat 1 órán át 37 °C-on hőshokoltuk, hogy minden sejtben aktiválódjon a Gal4 expresszió. 24 óra múlva fehérjemintát készítettünk a lárvákból.

Mintakészítés: a lárvák száraz tömegét lemértük, majd 1 mg-hoz 20 µl 1:1 Laemli/PBS oldatot adtunk. A mintákat 5 percig 100 °C-on forraltuk, majd kézi homogenizálóval alaposan elhomogenizáltuk. Újabb 5 perc forralás után 5 perc centrifugálás következett (13000 rpm), majd a felülúszót átpipettáztuk egy steril eppendorf csőbe. A mintákat -20 °C-on tároltuk a felhasználásig.

Egyenlő mennyiségű fehérjemintát felvittünk, majd szétválasztottunk SDS poliakrilamid gélelektroforézissel 8 illetve 13%-os gélen (futtató puffer: 0,025 M Trizma base, 0,2 M Glycine, 0,05% SDS). A gélről Immobilon-P PVDF membránra (Millipore) transzformáltuk a fehérjéket (transzfer puffer: 0,025 M Trizma base, 0,2 M Glycine, 10% metanol). A membránokat kazein blokkoló pufferben blokkoltuk (0,5% casein (Sigma) feloldva 0,1 M Trizma base-ben, majd a pH-t 7,5-re állítottuk HCl-el) 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Ezután a blottokat 3x5 percig mostuk TBST-ben (0,025 M Trizma base pH 7,5-re állítva HCl-el, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20), majd szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk az elsődleges ellenanyaggal kazein blokkoló puffer/TBST 1:1 oldatában. Ezt 3x10 perc mosás követte TBST-ben, majd a membránokat AP (alkalikus foszfatáz)

konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten kazein blokkoló puffer/TBST 1:1 oldatában. A blottokat 3x10 percig TBST-ben, 1x5 percig AP pufferben mostuk (100 mM Trizma base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05% Tween 20, pH 9,5-re állítva HCl-el), majd előhívtuk AP pufferben hígított (1:50) NBT-BCIP-vel (törzsoldat: Sigma).

Felhasznált ellenanyagok és hígításaik: nyúl anti-p62 (1:5000), nyúl anti-Atg8 (1:5000), egér monoklonális anti-Tubulin AA4.3 (1:1000, DSHB), AP konjugált kecske anti-nyúl (1:5000, Millipore), AP konjugált kecske anti-egér (1:5000, Millipore).

4.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia

cg-Gal4 driverrel kereszteztük az RNSi vonalakat, majd a lárvákat fixáló oldatban (3,2% paraformaldehid, 1% glutáraldehid, 1% szukróz, 2 mM CaCl₂ és 0,1 M kakodilát pufferben, pH 7,4) boncoltuk ki, majd 12 órán át 4 °C-on fixáltuk. Ezután 0,1 M kakodilát pufferrel mostuk ki a felesleges fixálót, majd 1 órán át 0,5%-os ozmiumtetroxidban utófixáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. Kétszer 10%-os acetonnal öblítettük, 30 percig 2%-os uranil-acetáttal mostuk, majd víztelenítettük a mintákat felszálló etilalkohol sorral (50%, 70%, 2x 96%, 2x abszolút alkohol 15-15perc). Ezután 15 perc propilénoxidos mosás követte, majd propilénoxid:Araldite 3:1 arányú keverékével itattuk át 60 percig a szöveteket. Ugyanígy 60 percig az 1:1 arányú keverékben és egy éjszakán át az 1:3 arányú keverékben forgattuk a mintákat. Másnap újra 1:1 keverékre cseréltük 60 percre, lapos formába Araldite műgyantát öntöttünk, amibe a mintákat áthelyeztük, orientáltuk, majd 2 napig 60 °C-on polimerizáltattuk. A polimerizáció után ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket ólom-citráttal és uranil-acetáttal kontrasztosítottunk. Az elkészült metszeteket Jeol JEM-1011 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a képek Olympus Morada 11 megapixeles kamerával és iTEM szoftver (Olympus) segítségével készültek.

4.8. Statisztika

A statisztikai analízishez a LysoTracker Red, mCherry-Atg8a és GFP-mCherry-Atg8a pöttyöket valamint a sejtméreteket kézzel számoltuk le Adobe Photoshop programban. A GFP-C11 aggregátum, az anti-p62 és az anti-Atg8a immunjelölést ImageJ

(NIH) program segítségével értékeltük ki, a küszöbértéket az adott kép paramétereinek megfelelően állítottuk be. Az adatokat PASW Statistics 18 (korábban SPSS Statistics) programmal dolgoztuk fel a **2. függelékben** jelzett módon. A táblázatban minden ábra esetén fel van tüntetve a genotípus, az átlag, a standard error és a mintaszám (n). Páronkénti összehasonlításnál a p értéket kétoldali kétmintás nem egyező varianciájú Student t-próbával számoltuk a normál eloszlású adatoknál vagy Mann-Whitney u-próbával a nem normál eloszlású adatoknál. Többszörös összehasonlítás esetén ANOVA-t használtunk a normál eloszlású adatoknál és Kruskal-Wallis próbát a nem normál eloszlású adatoknál. A $p < 0,05$ értékeket statisztikailag szignifikáns eltérésnek tekintettük, a nem szignifikáns p értékeket szürke háttérrel emeltük ki. Az oszlopdiagrammokon az átlagot és a standard errort ábrázoltuk.

A korreláció és regresszió vizsgálatokhoz a GFP-CL1 expozíciós időket a képek metadata fájljából nyertük, a Lysotracker Red pöttyszámot és a sejtméreteket kézzel számoltuk le Adobe Photoshop programban, a p62 pötty számot és méretet ImageJ (NIH) program segítségével mértük. A kiértékelést PASW Statistics 18 szoftverrel végeztük. A GFP-CL1 szint (az expozíciós idő reciproka) – sejtméret korreláció illetve a p62 pötty méret/sejt – sejtméret korreláció esetén Spearman-féle rang korreláció tesztet alkalmaztunk, mivel az adatok nem normál eloszlást mutattak. A Lysotracker Red pöttyszám/sejt – klón/kontroll sejtméret regresszió vizsgálat „Power” regressziós modellel készült.

5. EREDMÉNYEK

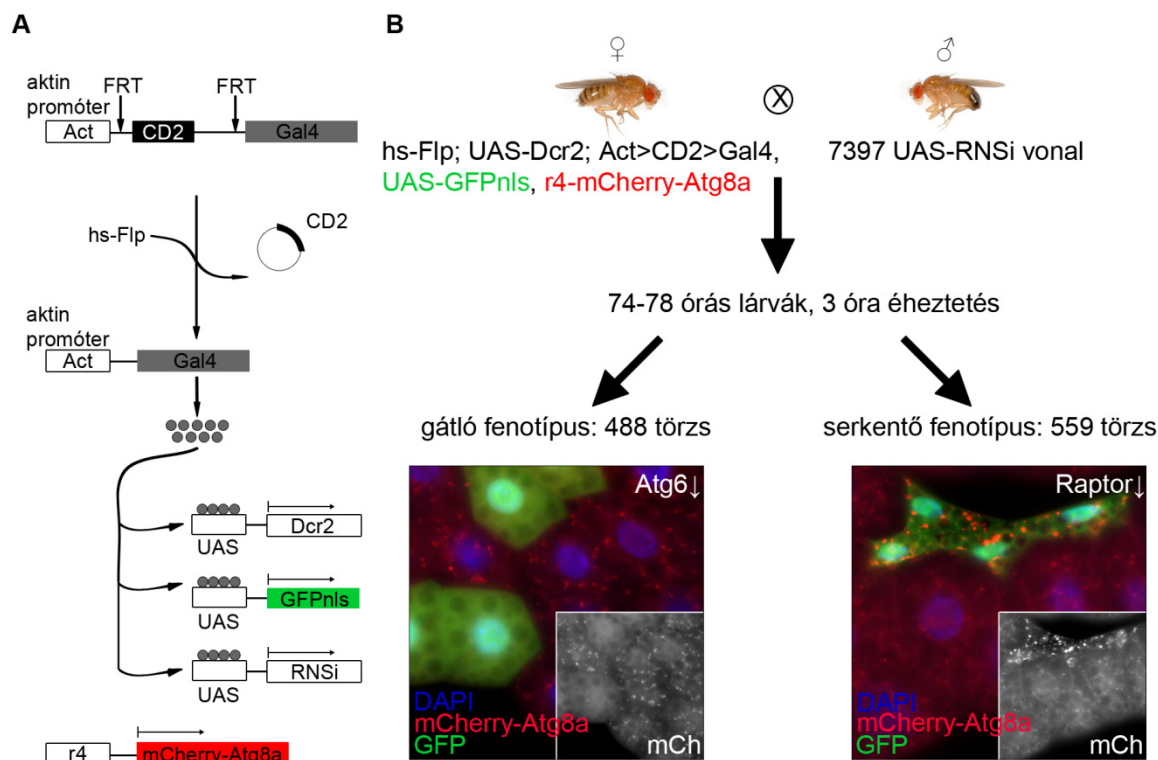
5.1. Teljes genom RNS interferencia szűrés

Célunk az volt, hogy az autofágia genetikai szabályozását és molekuláris mechanizmusait részletesebben megismerhessük. Ehhez egy nagyszabású, körülbelül két évig tartó projektben két hallgatótársammal közösen egy in vivo teljes genom szűrést végeztünk RNS interferencia segítségével.

5.1.1. Az elsődleges szűrés

Az elsődleges teszt során szomatikus sejtklónokat vizsgáltunk éheztetett, mCherry-Atg8a autofág riportert kifejező *Drosophila* lárvák zsírtestében. 7397 transzgenikus UAS-RNSi vonalat vizsgáltunk meg, amely némi redundancia következtében 7119 egyedi gén csendesítését tette lehetővé, és lefedte a humán homológgal rendelkező, evolúciósan konzervált *Drosophila* gének 90%-át. Az Atg gének és inzulin/TOR jelátvitelt vizsgáló előkísérletek alapján 84%-os találati arányt (16% fals negatív) becsültünk (42/50 RNSi vonal mutatta a várt fenotípust). A fals pozitív találatok számát 2% alattinak becsültük, mivel az extracelluláris fehérjéket kódoló gének csendesítése csak 1/54 esetben okozott fenotípusos eltérést. A 7397 RNSi vonalból 1768 első generációs könyvtárból származik (GD könyvtár, VDRC), 5159 második generációs könyvtárból (KK könyvtár, VDRC), valamint 470 vonalat a Bloomington Drosophila Stock Center (TRiP könyvtár) biztosított.

Mivel klonális expressziót használtunk, így egy mintán belül, egymás mellett vizsgálhattuk a kontroll és RNS interferenciás sejteket. Erre a célra az UAS-Gal4 és az Flp/FRT rendszert is hordozó hs-Flp; UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a (Chang és Neufeld, 2009) (**10. ábra A**) törzsből gyűjtött szüzeket kereszteztük az UAS-RNSi hímekkel. A Dcr2 enzim túltermeltetése növeli az RNS interferencia hatékonyságát. Az mCherry-Atg8a transzgén az r4 konstitutív promóter szabályozása alatt áll, amely a zsírtestben és a nyálmirigyben fejeződik ki, jelöli a fagofórt, az autofagoszómát és autolizoszómát is. A lárvákat 29 °C-on tartottuk, mivel előkísérleteink alapján magasabb hőmérsékleten hatékonyabb a géncsendesítés a nagyobb Gal4 aktivitás miatt. A 74-78 órás L3 stádiumú éheztetett lárvák zsírtestét fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk (**10. ábra B**).



10. ábra Az elsődleges teszt összefoglalása. (A) Az Flp/FRT és az UAS-Gal4 rendszer bemutatása. A hőshock promóter szabályozása alatt álló Flp az FRT helyeken rekombinációt idéz elő, így a CD2 kazetta kivágódik. Az ennek hatására képződő Gal4 fehérje az UAS helyekhez kötődve aktiválja a Dcr2, a GFP és az RNSi transzgén átíródását. Az mCherry-Atg8a transzgén a konstitutív r4 promóter szabályozása alatt áll. (B) Az elsődleges teszt során hs-Flp; UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a szüzeket kereszteztünk UAS-RNSi hímekkel, a 74-78 órás lárvák zsírtestét 3 óra éheztetés után fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. A GFP-vel jelölt RNSi klónsejtekben az mCherry-Atg8a pöttyöket értékeltük a szomszédos kontroll sejtekhez képest. Két fő autofágia fenotípus: gátló (pl.: Atg6 RNSi) és serkentő (pl.: Raptor RNSi). A jobb alsó sarokban a piros csatorna lett kiemelve fekete-fehérben.

A kiértékelés során hárman egymástól függetlenül, vakon pontoztuk -2-től +2-ig az mCherry-Atg8a pöttyök méretét, számát, intenzitását, és feljegyeztünk egyéb jellegzetes fenotípusokat is (pl.: lekerekedett sejthalak, perinukleáris mCherry-Atg8a pöttyök, stb.). Az mCherry-Atg8a értékeket átlagoltuk, majd öt autofágia fenotípus kategóriába soroltuk az RNSi vonalakat: nincs hatás, enyhe és erős gátló, valamint enyhe és erős serkentő fenotípus. A teszt alapján 488 RNSi vonal gátolta, míg 559 serkentette az mCherry-Atg8a jelet a GFP-vel jelölt klónsejtekben a környező kontroll sejtekhez képest (**10. ábra B és 2. táblázat**).

	mCherry-Atg8a érték	RNSi vonalak száma	%
nincs hatás	0	6350	85,9
erős gátlás	-2	224	3
enyhe gátlás	$-1 \leq \text{érték} < -2$	264	3,6
erős serkentés	2	334	4,5
enyhe serkentés	$1 \leq \text{érték} < 2$	225	3
		7397	100

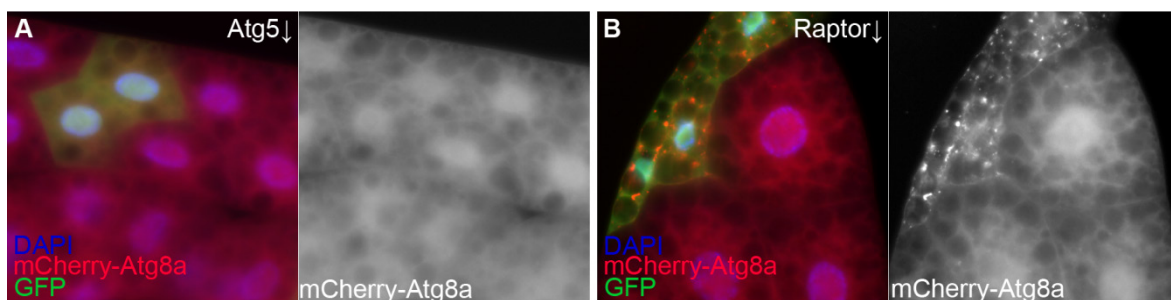
2. táblázat Az autofágia fenotípusok megoszlása az elsődleges teszt alapján. A három mCherry-Atg8a érték átlaga alapján öt csoportba soroltuk a megvizsgált 7397 RNSi vonalat. A csoportokba került RNSi vonalak száma és a százalékos megoszlás is látható.

A -1 és 1 közé eső értéket kapó törzsekre úgy tekintettünk, hogy az RNS interferenciának nincs jelentős hatása az autofágiára, ezért az ebbe a kategóriába eső 6350 RNSi vonalat a másodlagos tesztekben nem vizsgáltuk tovább.

5.1.2. A másodlagos szűrések

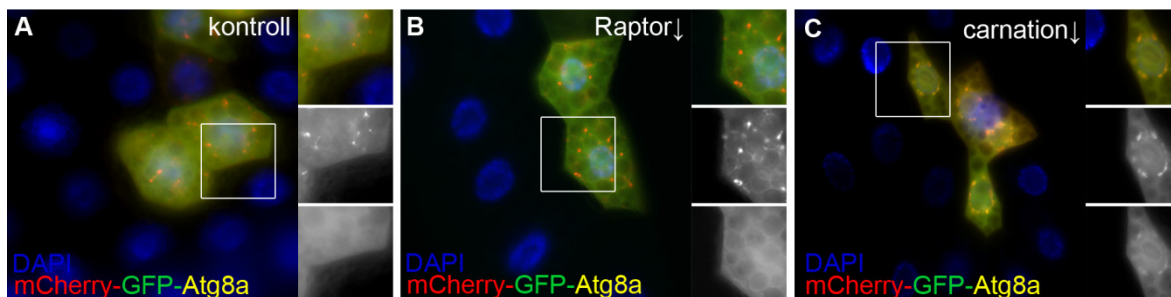
A másodlagos tesztek célja az volt, hogy kiszűrjük a több mint ezer találat közül azokat, amelyek feltehetően nem közvetlenül hatnak az autofágiára, mint például a háztartási gének, így leszűkítjük a találatokat a valóban autofágiához szükséges génekre.

Az első teszttel megegyezően az mCherry-Atg8a riportert használtuk, csak most jól táplált lárvákban vizsgáltuk az RNS interferencia hatását. Két fő fenotípus kategóriába osztottuk az RNSi törzseket: 1. nincs változás a környező kontroll sejtekhez képest, 2. hiperautofág, azaz mCherry-Atg8a pozitív struktúrák halmozódnak fel éheztetés nélkül is, vagyis túlműködik a bazális autofágia (**11. ábra**). Az éheztetéses tesztben gátló fenotípusúak közül 308 vonal nem mutatott különbséget, míg 180 hiperautofág volt táplálékkal jól ellátott körülmények között. Az éheztetve serkentők közül 203-nak nem volt hatása, míg 356 vonal esetén történt mCherry-Atg8a felhalmozódás. Érdekes adat, hogy az éheztetve gátló és táplálkozóban hiperautofág 180 vonal közül 73 riboszómális gént csendesít, azaz a fenotípus valószínűleg az alapvető sejtfolymatok megzavarásának köszönhető, nem pedig az autofágiára gyakorolt specifikus hatás miatt.



11. ábra Másodlagos teszt: jól táplált lárvák vizsgálata. Két fő fenotípus kategóriát különböztettünk meg: az RNS interferencia hatására a GFP-vel jelölt klónsejtekben nincs változás a környező kontroll sejtekhez képest (pl. Atg5) (A) vagy hiperautofág, azaz mCherry-Atg8a pozitív autofagoszómák és autolizoszómák halmozódnak fel (pl. Raptor) (B) jól táplált lárvák zsírtestében. Jobb oldalon a piros csatornát emeltük ki fekete-fehérben.

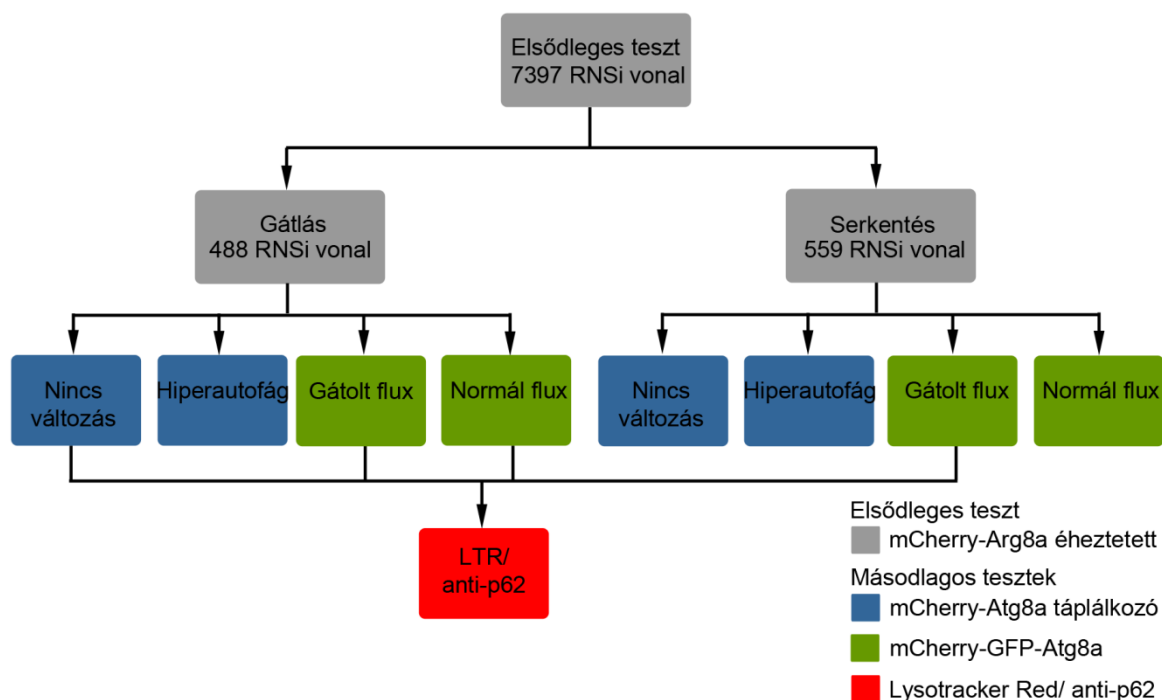
A következő tesztben mCherry-GFP-Atg8a kettősen jelölt riportert használtuk az autofág flux vizsgálatára éheztetett lárvák zsírtestében. Ez a riporter szelektíven az autolizoszómákba jut, ahol a savas környezetben a GFP gyorsan inaktiválódik, míg az ellenállóbb mCherry fluoreszcens marad. Így azt vizsgálhatjuk, hogy az autofágia indukciója vagy a lebontás gátlása okozza-e az autofág struktúrák felhalmozódását. Ennél a kísérletnél csak a klónsejtekben fejeződik ki a fluoreszcens riportert, így a környező szövet nem használható kontrollként, de nem is szükséges, mert az éheztetés hatására megjelenő autofág struktúrák mCherry és GFP fluoreszcenciáját értékeltük. A kontrollban csak mCherry pozitív jelet látunk, azaz a lizoszómális lebontás zavartalanul zajlik (**12. ábra A**). Az RNS interferencia hatása alapján két fenotípus kategóriát különítettünk el: 1. normál flux, amelyben a kontrollal megegyezően csak mCherry jelet láttunk, 2. gátolt flux fenotípus, ahol az autofág struktúrák jó része mind mCherry mind GFP pozitív, azaz a lebontás valamelyik lépése gátolt (**12. ábra B, C**).



12. ábra Másodlagos teszt: autofág flux vizsgálata. Az mCherry-GFP-Atg8a riportert segítségével a kontroll (A) és a normál flux fenotípus esetén (pl. Raptor RNSi) (B) csak

mCherry pozitív struktúrákat láthatunk az éheztetett lárvák zsírtestében, mivel a GFP inaktiválódik. Gátolt flux fenotípusnál (C) egyszerre mCherry és GFP pozitívak a felhalmozódó autofág vakuólák, mint a carnation RNSi esetén, ahol az autofagoszómá-lizoszóma fúzió gátolt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

A további kísérletekből kihagytuk az éheztetve gátló, de táplálkozóban hiperautofág és normál flux fenotípusú törzseket. Valamint az éheztetve serkentők közül csak a gátolt flux fenotípusúakat vizsgáltuk tovább, hiszen főleg az autofág lebontáshoz szükséges génekre koncentráltunk, mint például a már ismert Atg gének (**13. ábra**).

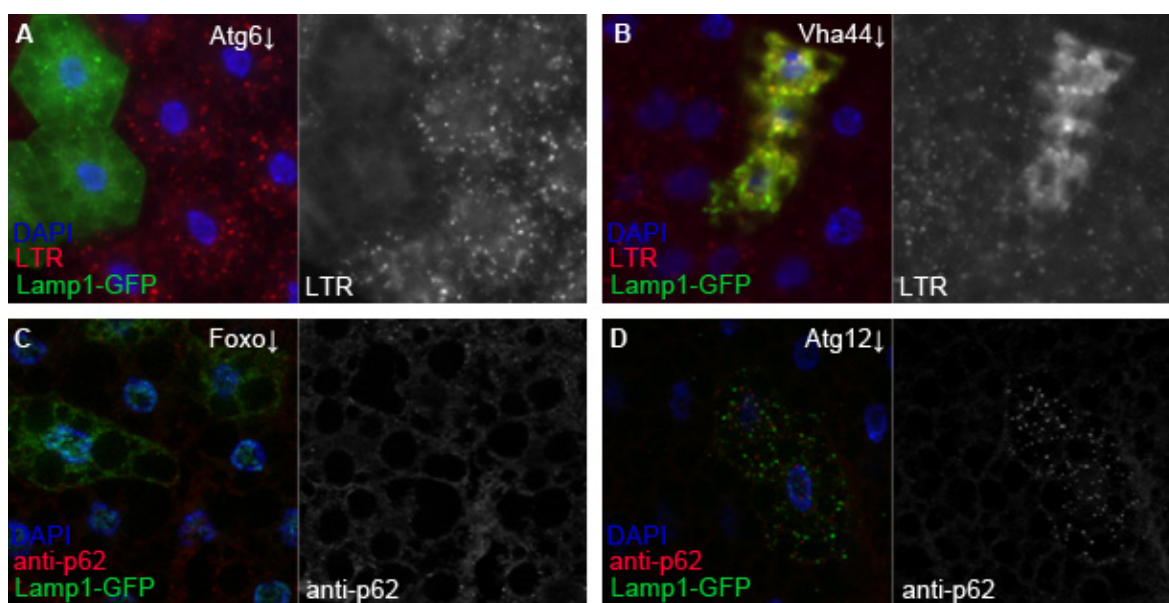


13. ábra A teljes genom szűrés összefoglalása. Az elsődleges teszt során éheztetett lárvák zsírtestében a GFP-vel jelölt RNSi klónsejtekben az mCherry-Atg8a pöttyöket vizsgáltuk a szomszédos kontroll sejtekhez hasonlítva. A kb. ezer fenotípust adó találatot először táplálkozó állatokban mCherry-Atg8a riporterrel, majd éhezített körülmények között mCherry-GFP-Atg8a riporterrel vizsgáltuk. A Lysotracker Red festést és a p62 immunfestést csak az ábrán jelölt négy csoporton végeztük el.

A következő tesztben a fennmaradó 4 csoport, mintegy 380 RNSi vonalát vizsgáltuk. A Lamp1-GFP (lysosomal-associated membrane protein 1) késői endoszóma, lizoszóma marker expressziója jelölte az RNSi sejteket, és Lysotracker Red (LTR) festéssel tettük láthatóvá a savas organelumokat, azaz az autolizoszómákat az éheztetett lárvák zsírtestében. Ez volt az első nem transzgénikus Atg8a riporterrel alapuló, tehát

független teszt. A kiértékeléskor a LTR pöttyök számát pontoztuk -2-től +2-ig, ugyancsak hárman egymástól függetlenül. Két fő fenotípus kategóriát különböztethetünk meg: éheztetés hatására a LTR pöttyök felhalmozódása gátlódik, vagy serkentődik az RNSi sejtekben (**14. ábra**).

Ugyanezekon a vonalakon még egy tesztet elvégeztünk: immunfestéssel mutattuk ki a p62 szelektív autofágia receptor jelenlétét. Ez normál esetben az ubiquitinált fehérjéket, aggregátumokat köti és autofág lebontásra irányítja. Amennyiben a bazális autofágia sérül, p62 felhalmozódást tapasztalhatunk. Két nagy fenotípus kategóriát különítettünk el: az RNSi klónsejtekben nincs változás a környező kontroll sejtekhez hasonlóan, vagy fokozott anti-p62 aggregátumképződést láttunk (**14. ábra**). Fontos, hogy a p62 felhalmozódás még Atg gének csendesítése esetén sem mindig alakul ki mivel erős időfüggést mutat (Pircs és mtsai, 2012). Az ezzel a tesztrel kapott negatív eredmény tehát nem zárja ki a lehetőséget, hogy az adott gén az autofágiához szükséges.



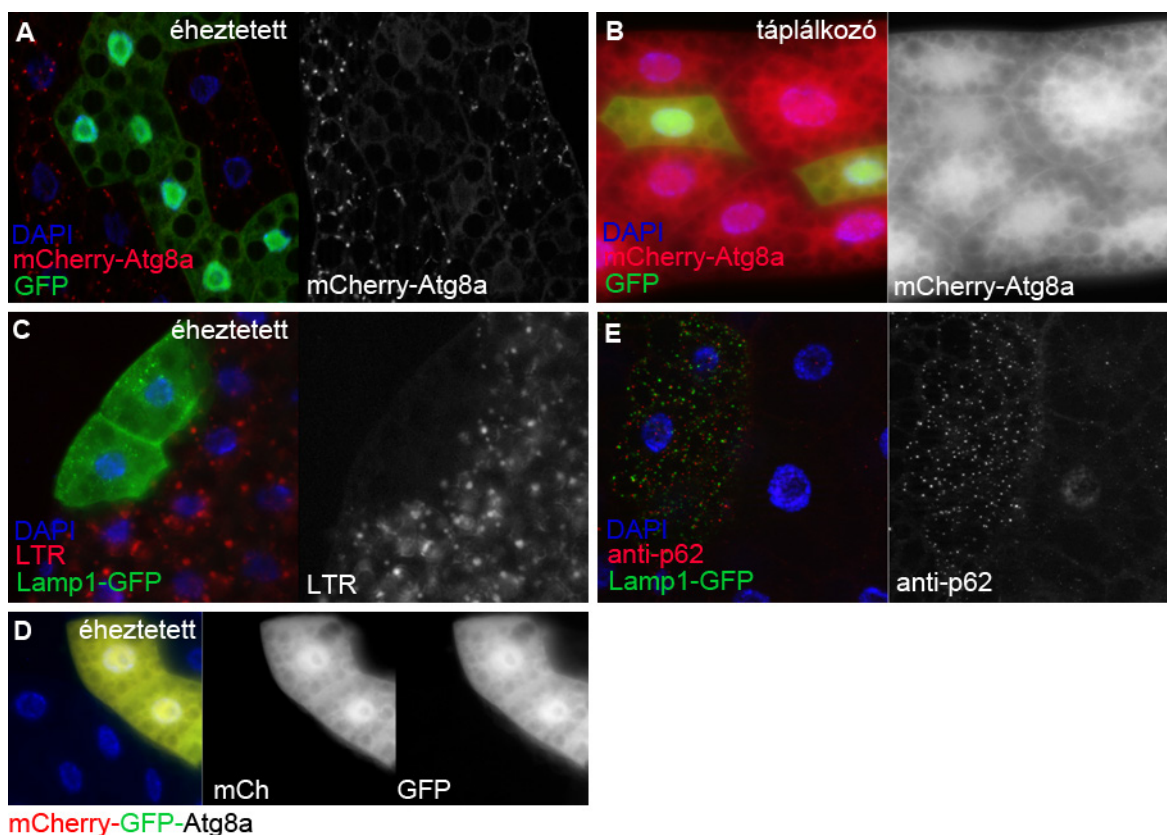
14. ábra Másodlagos tesztek: LysoTracker Red festés és anti-p62 immunfestés. (A, B) A Lamp1-GFP-vel jelölt RNSi klónsejtekben a LTR festődést vizsgáltuk: az Atg6 RNSi (A) gátolta, a Vha44 (B) serkentette a LTR pozitív struktúrák megjelenését. (C, D) Immunfestéssel a p62 szelektív autofágia receptort mutattuk ki. A Foxo RNSi (C) hatására nem változott az eloszlása a kontroll sejtekhez képest, míg az Atg12 RNSi (D) sejtekben nagymértékben felhalmozódott. Jobb oldalon a piros csatornát emeltük ki fekete-fehérben.

5.1.3. A tesztek alapján kialakított fenotípus kategóriák

Az mCherry-GFP-Atg8a riporter és a LTR festés eredményei alapján három nagy csoportba soroltuk a megmaradt vonalakat, így az általuk csendesített géneket. Azokat az ellentmondásos eredményt mutató vonalakat, amelyek az elsődleges tesztben gátolták az mCherry-Atg8a pöttyképződést, ám a LTR-t nem, kihagytuk a csoportokból és a további vizsgálatokból.

5.1.3.1. Az ATG csoport

Az első csoportba a mCherry-GFP-Atg8a-t és LTR-t gátló fenotípusú vonalak kerültek, azaz nem alakulnak ki autofagoszómák és autolizoszómák, a teljes autofág lebontás gátolt. Erre egy példa a FIP200, amely az Atg1 kináz komplex tagja *Drosophilában* (**15. ábra**, kézirat közlésre beküldve). Ide tartoznak a központi autofág gének és az Atg génektől upstream ható jelátviteli tagok (pl. Tsc1, Tsc2, Pten), így ezt ATG csoportnak neveztük el. 78 gén tartozik ebbe a csoportba.



15. ábra A FIP200 RNSi autofágia fenotípusa a tesztek során. A GFP-vel jelölt RNSi sejtekben gátolt az mCherry-Atg8 (A,B), a LTR (C) és az mCherry-GFP-Atg8a (D) jelölés, míg a p62 felhalmozódik (E).

Egy találat ebből a csoportból az evolúciósan konzervált Myc, amelyet részletesen is vizsgáltunk. Ez a transzkripciós faktor egy proto-onkogén, amely elősegíti a sejtnövekedést és fehérje szintézist, valamint eredményeink szerint az autofágiát is szabályozza *Drosophilában*. A Myc hiánya gátolja az autofágiát, míg túltermeltetése sejtnövekedéshez, és fehérje felhalmozódáshoz vezet, ami az UPR-en (unfolded protein response) keresztül autofágiát és antioxidáns választ indukál. Az UPR, az autofágia vagy az antioxidáns válasz gátlásával megakadályozható a Myc-et túltermelő sejtek túlnövekedése, viszont ezek a genetikai manipulációk a kontroll sejtek növekedését nem érintik (Nagy és mtsai, 2013). Ezeknek a kísérleteknek az elvégzésében én is tevékenyen részt vettem, a részletes eredmények Nagy Péter munkatársam doktori értekezésében olvashatók.

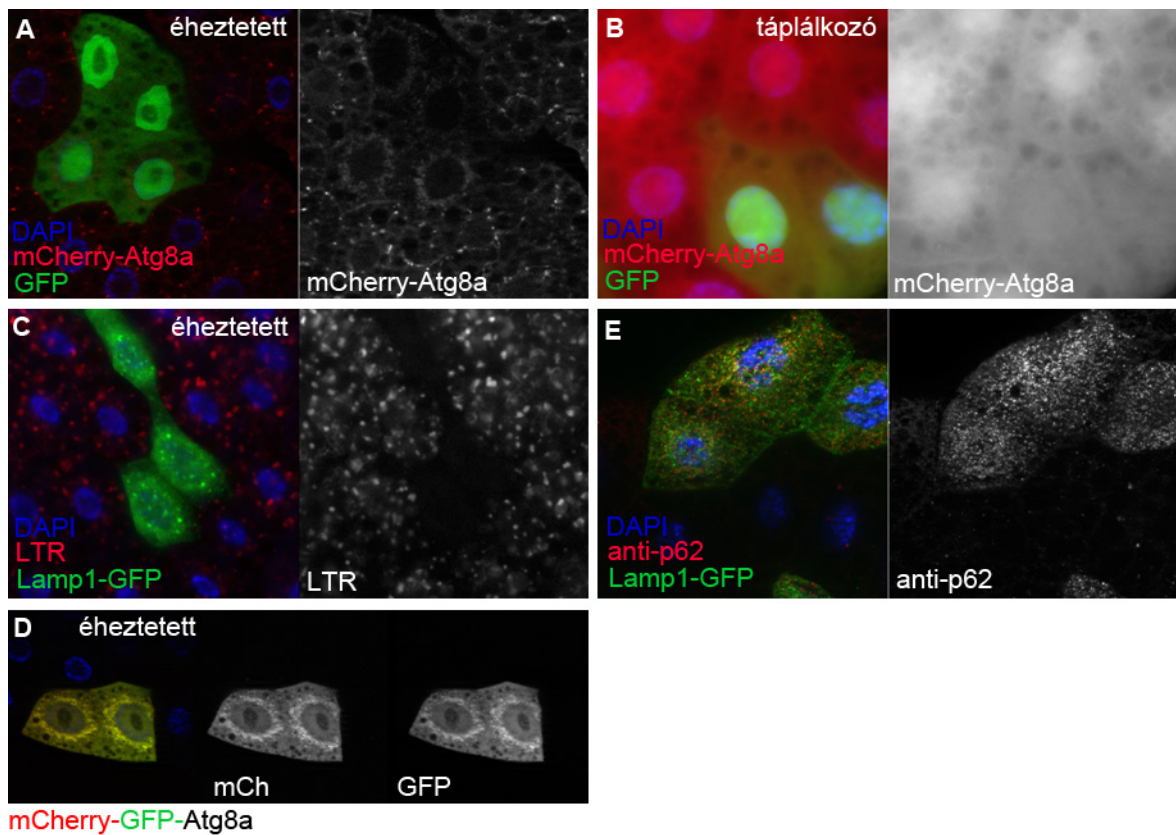
A legtöbb humán tumorban a Myc deregulált expressziója felelős a tumor növekedésért. Eredményeink felvetik a lehetőséget, hogy az UPR-t, az autofágiát és az antioxidáns választ megcélzó új, a sejtnövekedést gátló gyógyszereket fejlesszenek a Myc-et túltermelő tumorok kezelésére. A legújabb kutatási eredmények szerint a Myc humán sejtekben is szükséges az autofágiához, és az autofágia és az UPR gátlása megakadályozza a Myc indukálta tumorigenezist egerekben (Hart és mtsai, 2012; Toh és mtsai, 2013).

5.1.3.2. Az autofagoszóma csoport

A második csoportba a gátolt flux és gátolt LTR festődésű törzsek kerültek. Ez azt jelenti, hogy a az autofagoszómák felhalmozódnak, mert nem képesek lizoszómával fuzionálni, így a lebontás is gátolt. Ide tartoznak az autofagoszóma érésben szerepet játszó gének, mint például a C-típusú Vps komplex tagjai, amelyek az autofagoszóma-lizoszóma fúzióban vesznek részt. Ebbe a komplexbe tartozik a Vps16a (**16. ábra**, kézirat közlésre beküldve). Ezt AP (autofagoszóma) csoportnak neveztük el, 47 gén került ide.

Egyik tagja a csoportnak a Syntaxin17 (Syx17), amelyet tovább vizsgáltunk. A Syx17 a SNARE fehérjék közé tartozik, amelyek a vezikula fúzióban játszanak szerepet. Kísérleteinkel kimutattuk, hogy a Syx17 az autofagoszómák külső membránjához toborzódik, ahol az ubisnap (SNAP-29) és a VAMP7 fehérjékkel komplexet képez, ami szükséges az autofagoszómák és lizoszómák fúziójához. Ezen gén hiánya

autofagoszómák felhalmozódásához vezet és gátolja az autolizoszómális lebontást a bazális, az éhezéssel indukált és a fejlődési autofágia esetén egyaránt. Syx17 mutáns adult muslicák neuronjaiban is nagymértékű autofagoszóma akkumuláció figyelhető meg, amely feltehetően kiváltó oka az általunk megfigyelt neuromuszkuláris diszfunkciónak (Takats és mtsai, 2013). Tehát a megfelelő autofág lebontás elengedhetetlen az idegrendszer normál funkciójának fenntartásához. Ezekben a kísérletben is részt vettem, a részletes eredmények Takats Szabolcs munkatársam doktori disszertációjában lesznek bemutatva.



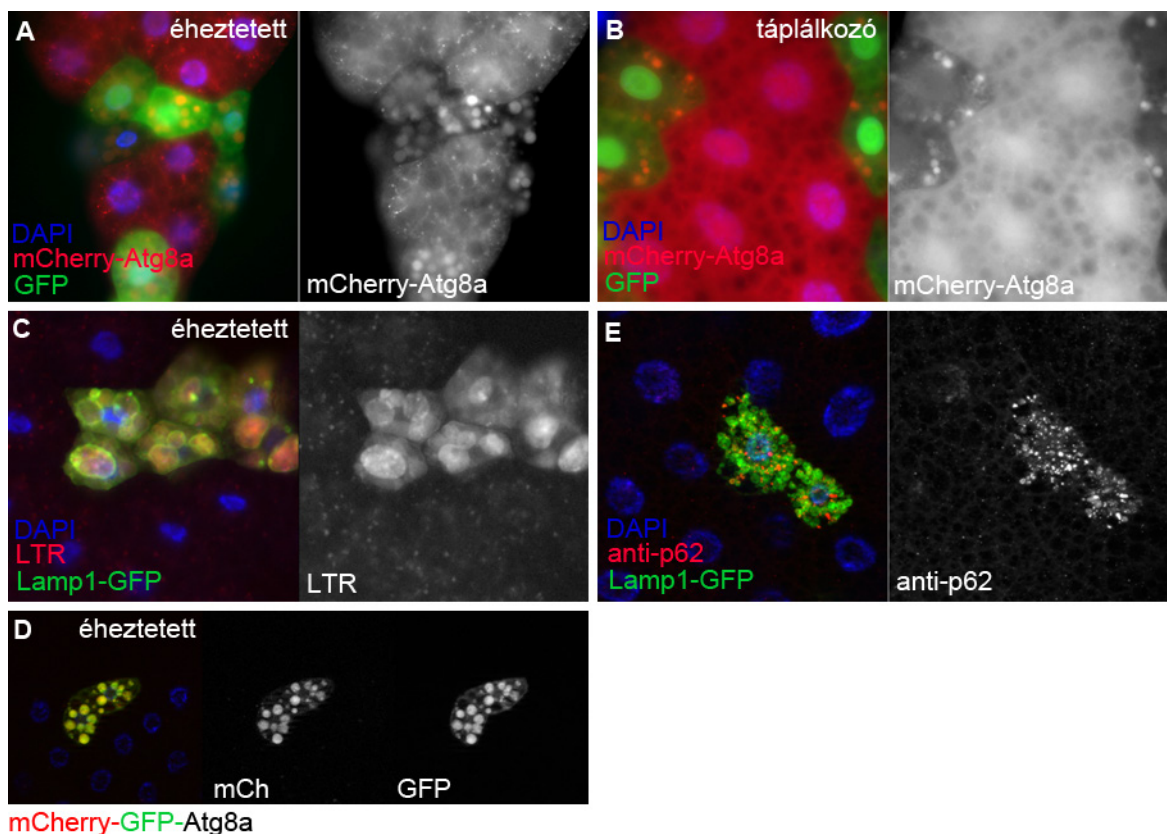
16. ábra A Vps16a RNSi autofágia fenotípusa a tesztek során. A GFP-vel jelölt klónsejtekben kisméretű mCherry-Atg8 pozitív pöttyöket láthatunk éhezéttetés esetén (A), míg táplálkozó állapotokban nincs különbség (B). A LTR festődés gátolt (C), az mCherry-GFP-Atg8a (D) és a p62 (E) felhalmozódik. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió gátolt, így kisméretű autolizoszómák akkumulálódnak a sejtekben.

5.1.3.3. Az autolizoszóma csoport

Jellemző fenotípus a felhalmozódó mCherry-Atg8a éhezéttett és táplálkozó lárvákban egyaránt, mCherry és GFP felhalmozódás az mCherry-GFP-Atg8a autofág flux riporter vizsgálatakor, erős Lysotracker Red festődés éhezettett állatokban, valamint a p62

szelektív autofágia receptor akkumulálódása. A lebontás valamilyen okból nem megfelelő ezért citoplazmás anyagokat tartalmazó autolizoszómák halmozódnak fel. Ebbe a csoportba tartoznak a normál lebontásért felelős gének, például a Vha16-1, amely a lizoszómális proton pumpa egy alegységeként a megfelelő savasodásért felelős (17. ábra). 88 gént soroltunk az AL (autolizoszóma) csoportba.

Az AL csoportba került számos proteaszóma alegység RNSi vonal. Érdekesnek találtuk, hogy minden esetben indukálódott az autofágia, azonban a flux gátolt volt. Eldöntöttük, hogy részletesen megvizsgáljuk a proteaszóma inaktiváció által indukált autofágia jelenségét és megpróbálunk fényt deríteni a két lebontó rendszer kapcsolatának mibenlétére.



17. ábra A Vha16-1 RNSi autofágia fenotípusa a tesztek során. A nagymérű autolizoszómákban felhalmozódik az mCherry-Atg8 (A,B), a LTR (C), az mCherry-GFP-Atg8a (D) és a p62 (E). A protonpumpa hiányában nem tud megfelelően savasodni a lizoszóma, így a lebontásra szánt anyagok megrekednek az autolizoszómákban.

5.2. Az ubiquitin proteaszóma rendszer szerepe az autofágiában

A teljes genom RNSi szűrés során a proteaszóma alegységet küdoló gének az autolizoszóma csoportba kerültek és azonos fenotípust mutattak: autofágia indukció éhezett és táplálkozó körülmények között, valamint gátolt autofág flux. Ennek alapján első feltételezésünk az volt, hogy ezekben a sejtekben az autolizoszómális lebontás gátolt (ez később hamisnak bizonyult).

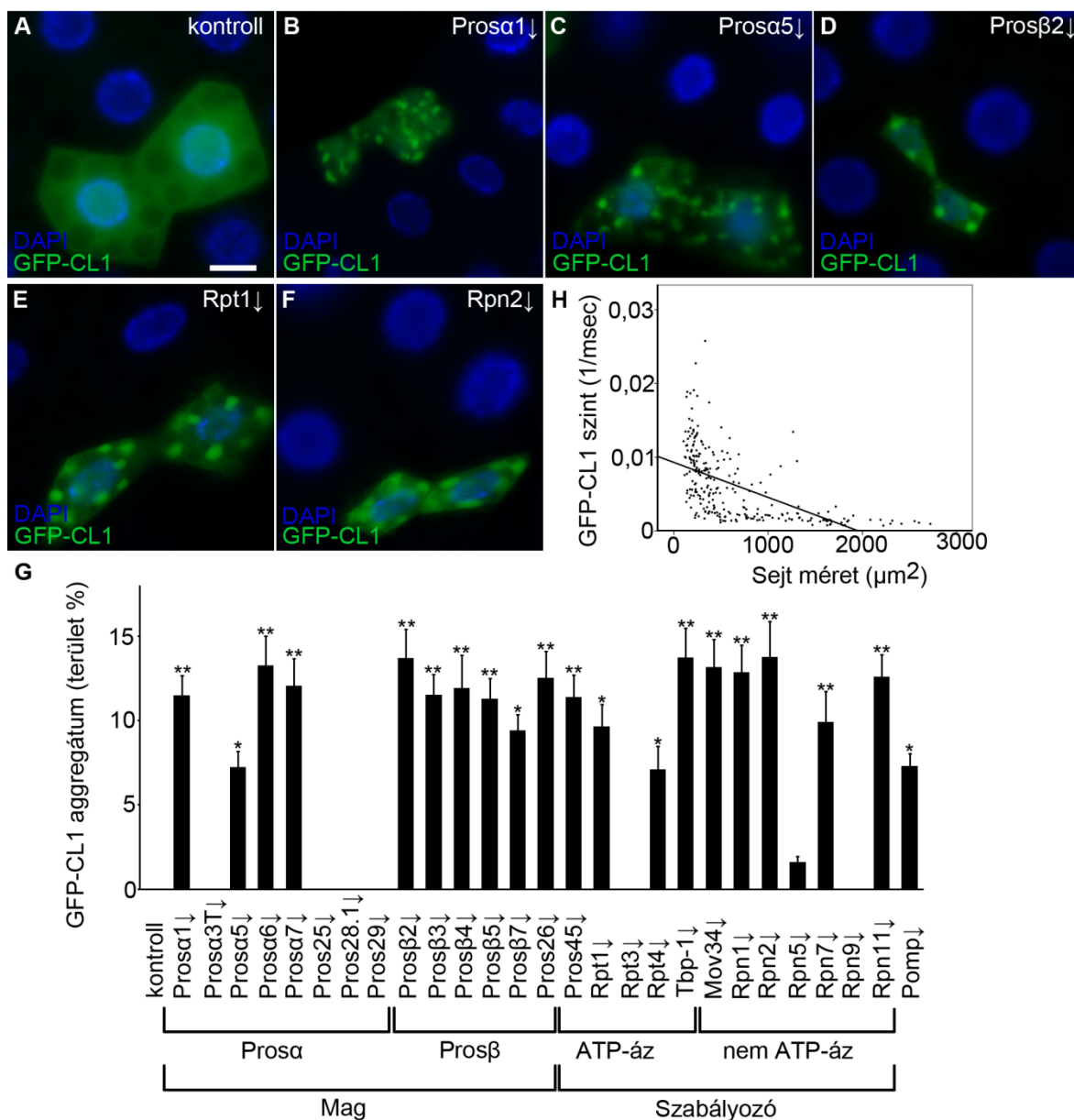
5.2.1. Különböző proteaszóma alegységek csendesítése a proteaszómális lebontás gátlásához vezet

Először szerettünk volna megbizonyosodni arról, hogy a látott fenotípusokat valóban a proteaszóma inaktiváció okozza, azaz a proteaszóma alegység RNS interferencia a proteaszómális lebontás gátlásához vezet. Ehhez először olyan transzgénikus *Drosophila* törzset használtunk, amelyben egy UPS aktivitás riporter fejeződik ki (Pandey és mtsai, 2007). Ez a fluoreszcens, fúziós fehérje a GFP-CL1. A CL1 peptid egy rövid, C-terminális degradációs szignál (Gilon és mtsai, 1998), amely proteaszómális lebontásra küldi az egyébként stabil GFP-t, így a fehérje szintje utal az UPS funkcionális állapotára.

A kontroll állatokban a zöld zsírtest klónsejtek a szomszédos sejtekkel megegyező méretűek és gyenge, homogén GFP fluoreszcenciát mutattak (**18. ábra A**). A 26-ből 19 különböző proteaszóma alegység RNS interferencia vonal esetén kis sejtméretet, valamint nagymértékű GFP-CL1 felhalmozódást és aggregátum képződést tapasztaltunk (**18. ábra B-F**), ami károsodott proteaszómális lebontásra utal. A károsodás mértékét a sejtek területéhez viszonyított GFP pozitív aggregátumokkal jellemeztük. Statisztikailag is kiértékeljük az eredményeket: 19 RNSi esetében a GFP-CL1 aggregátum terület % szignifikáns eltérést mutatott a kontroll sejtekhez képest (**18. ábra G**, a **2. függelék** tartalmazza a statisztikai kiértékelését ennek és a további kísérleteknek).

A proteaszóma éréséért felelős Pomp (proteasome maturation protein) a 20S mag komplex összeszerelődését szabályozza az endoplazmatikus retikulumban, így elengedhetetlen az újonnan képződő proteaszómák működéséhez. A különböző proteaszóma alegységekhez hasonlóan a Pomp csendesítése is GFP-CL1 felhalmozódáshoz vezetett (**18. ábra G**).

Regresszió analízissel igazoltuk, hogy a GFP-CL1 szint fordítottan arányos a sejtmérettel, azaz minél kisebb egy proteasóma RNSi klónsejt, annál nagyobb a GFP-CL1 fluoreszcencia mértéke (**18. ábra H**) (Spearman korrelációs koefficiens = -0,728, $p < 0,001$). Ez azt mutatja, hogy a proteasómális lebontás elengedhetetlen a zsírtest sejtek megfelelő növekedéséhez és endomitózisához, így a proteasóma károsodás kis sejtméretet okoz.



18. ábra Különböző proteasóma alegységek csendesítése csökkent mértékű proteasómális lebontáshoz vezet. (A) A kontroll állatokban a UPS aktivitás riporter GFP-CL1-et kifejező zsírtest klónsejtek a szomszédos sejtekkel megegyező méretűek és gyenge, homogén GFP fluoreszcenciát mutattak. A sejtmagot DAPI jelöli kék színnel. (B-F) A *Prosa1* (B), *Prosa5* (C), *Prosβ2* (D), *Rpt1* (E) és *Rpn2* (F) proteasóma alegység

RNSi sejtek kisebbek a kontroll sejteknél és nagyméretű GFP-CL1 aggregátumok alakultak ki bennük. (G) A proteaszóma RNSi GFP-CL1 aggregátum képződéséhez vezet a kontroll sejtekhez hasonlóan (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Feltüntettük a különböző proteaszóma alegység típusokat: 20S mag komplex (α és β) és 19S szabályozó komplex (ATP-áz és nem ATP-áz). A Pomp a 20S mag összeszerelődéséért felelős fehérje. (H) Regresszió analízis mutatja, hogy a GFP-CL1 szint fordítottan arányos a sejtmérettel. Spearman korrelációs koefficiens = $-0,728$, $p < 0,001$. Méretvonal az (A) panelen $20\ \mu\text{m}$ (A-F) paneleken egyaránt.

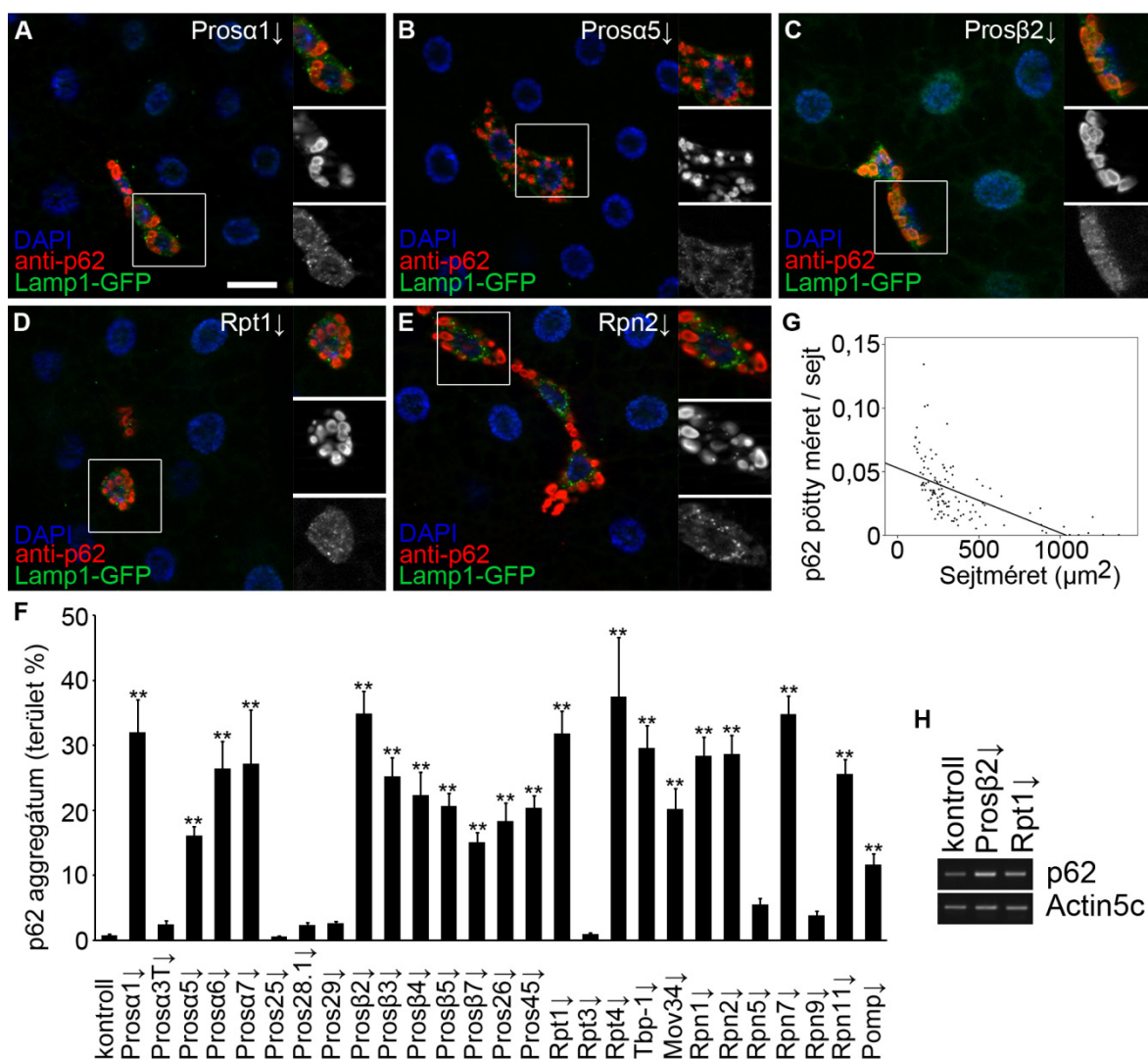
A következőkben megvizsgáltuk a p62 fehérje szintjét az RNSi sejtekben. A p62 specifikus autofág szubsztrát receptorként funkcionál, mivel elősegíti az ubiquitinált fehérjék szelektív autofág lebontását. Korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy a p62 aggregátumok ubiquitinált fehérjéket tartalmaznak (Bartlett és mtsai, 2011; Nezis és mtsai, 2008; Komatsu és mtsai, 2007). Feltételeztük, hogy a p62 szint megnő a proteaszóma károsodás esetén, mivel a felhalmozódó, le nem bomló ubiquitinált fehérjéket köti. A proteaszóma alegységek genetikai inaktivációjának hatására nagy mértékű p62 felhalmozódást tapasztaltunk western blot analízissel (**23. ábra G**). Immunfestéssel nagyméretű p62 aggregátumokat találtunk, amelyek nem kolokalizáltak a Lamp1-GFP lizoszóma markerral, azaz nem az autolizoszómák belsejében halmozódtak fel a fehérjék (**19. ábra A-E**). A p62 aggregátumok méretét a teljes klónsejt terület %-ában adtuk meg. Statisztikai analízis igazolta, hogy a 27 RNSi közül 20-ban szignifikánsan megnő a p62 aggregátum képződés (**19. ábra F**). Megfigyelhetjük, hogy ugyanaz a 7 RNSi vonal nem mutatott szignifikáns eltérést a GFP-CL1 és a p62 immunfestés vizsgálatakor. Ez arra utal, hogy ezekben a vonalakban nem működik megfelelően a géncsendesítés, bár az sem zárható ki, hogy valamelyik alegység funkciója nélkülözhető a proteaszóma megfelelő működéséhez.

Regresszió analízissel igazoltuk, hogy a területegységre jutó p62 pötty méret fordítottan arányos a sejtmérettel, azaz minél kisebb egy proteaszóma RNSi klónsejt, annál nagyobb a p62 aggregátumok mérete (**19. ábra G**) (Spearman korrelációs koefficiens = $-0,806$, $p < 0,001$).

A p62 mRNS szintje megnő éheztetés és stressz hatására *Drosophila* és emlős sejtekben egyaránt (Erdi és mtsai, 2012; Liu és mtsai, 2012; Kuusisto és mtsai, 2001). RT-PCR kísérlettel kimutattuk, hogy *Prosβ2* és *Rpt1* proteaszóma alegység RNSi szintén megnövelte a p62 transzkripció szintet a kontrollhoz képest (**19. ábra H**).

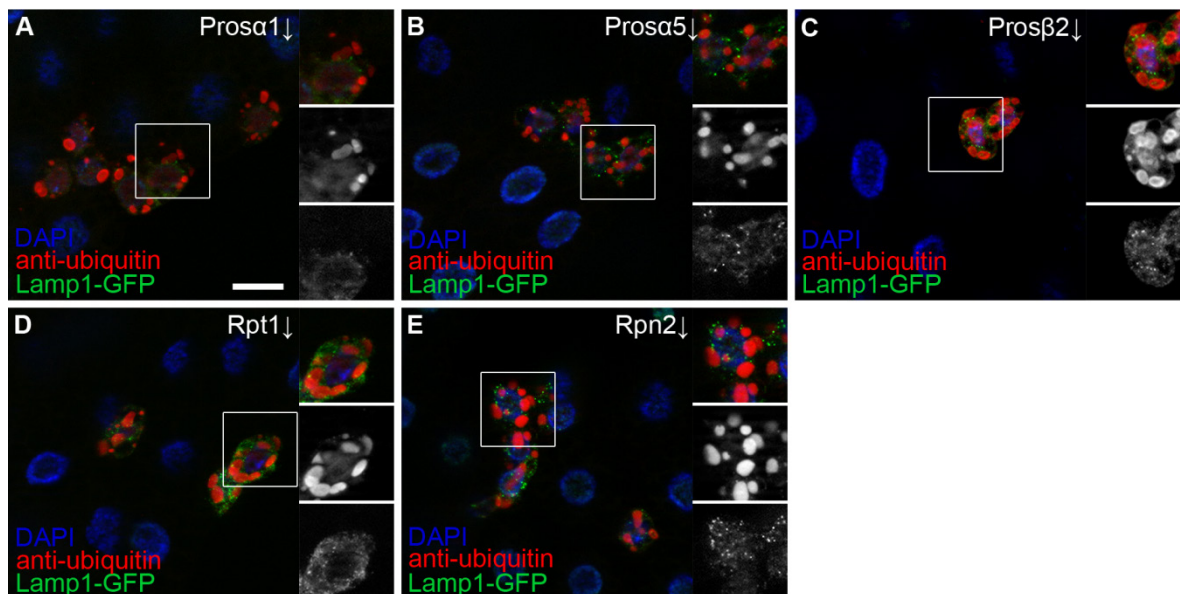
A további kísérletekhez a 27-ből kiválasztottunk 5 proteaszóma alegység RNSi vonalat, úgy hogy minden típusból legalább egy szerepeljen: *Prosa1*, *Prosa5*, *Prosβ2*

alegységek a 20S mag komplexből, és Rpt1, Rpn2 alegységek a 19S szabályozó komplexből.



19. ábra A proteaszóma genetikai inaktíválása p62 felhalmozódásához vezet (A-E) A *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosβ2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi a Lamp1-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben p62 felhalmozódáshoz vezet jól táplált állatokban. (F) 19 proteaszóma alegység és a Pomp RNSi p62 aggregátum képződéshez vezet a kontroll sejtekhez hasonlóan (** $p < 0,01$). (G) Regresszió analízis azt mutatja, hogy a p62 felhalmozódás fordítottan arányos a sejtmérettel. Spearman korrelációs együttható = -0,806, $p < 0,001$. (H) RT-PCR kísérlettel igazoltuk, hogy megnő a p62 mRNS szintje *Prosβ2* és *Rpt1* proteaszóma alegység RNSi esetén a kontrollhoz képest. Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A-E) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

A p62 immunfestésnél látotthoz hasonló méretű és eloszlású ubiquitinált fehérje aggregátumok halmozódnak fel proteasóma alegység RNSi hatására a zsírtest klónsejtekben (20. ábra A-E). Ez a vizsgálat is igazolja, hogy a proteasómális lebontás károsodott, így a le nem bomlott fehérjék aggregátumokat képeznek, amelyen nem kolokalizálnak a Lamp1-GFP lizoszóma markerral, azaz nem nagyméretű megrekedt autolizoszómákról van szó.



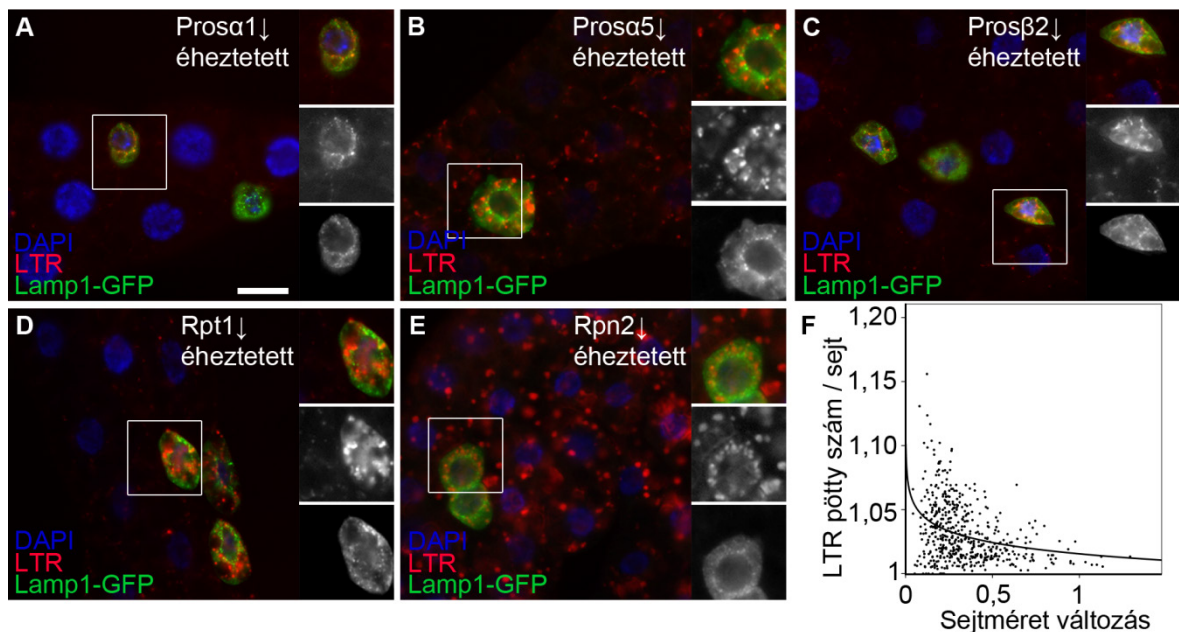
20. ábra A proteasóma genetikai inaktíválása ubiquitinált fehérjék felhalmozódásához vezet (A-E) A *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosb2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteasóma alegység RNSi a Lamp1-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben anti-ubiquitin felhalmozódáshoz vezet jól táplált állatokban. Méretvonal az (A) panelen 20 μ m (A-E) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

5.2.2. A proteasómális lebontás károsodása fokozza a bazális és éheztetéssel indukált autofágiát

A proteasóma alegység RNS interferencia éheztetés hatására megnövelte az autofág aktivitást a Lamp1-GFP markerrel jelölt zsírtest klónsejtekben a környező kontroll sejtekhez képest. Az autolizoszómákat Lysotracker Red (LTR) festéssel tettük láthatóvá (21. ábra A-E).

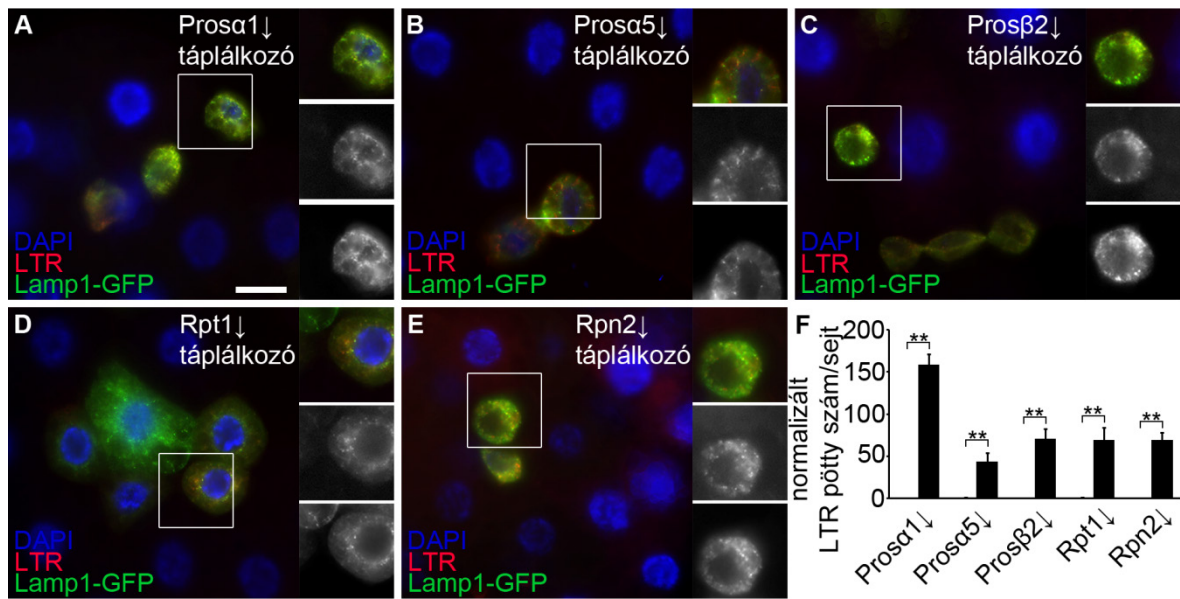
Regresszió analízissel megmutattuk, hogy a LTR granulumok száma fordítottan arányos a sejt méret változással (klón/kontroll sejt arány), azaz minél kisebb egy

proteaszóma RNSi klónsejt, annál nagyobb a relatív LTR pötty szám ($R=0,32$, $R^2=0,101$, $p<0,001$). A görbe linearizált egyenlete: $\ln(y)=\ln(a)+b*\ln(x)$, ahol $a=-0,012\pm0,002$; $p<0,001$ és $b=1,015\pm0,002$; $p<0,001$ (**21. ábra F**). Ez azt mutatja, hogy minél súlyosabb a proteaszóma károsodás, annál nagyobb mértékű az autofágia indukció és a sejtméret csökkenés.



21. ábra A proteasómális lebontás károsodása autofágiát indukál éheztetett *Drosophila* lárvák zsírtestében (A-E) A *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosβ2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi a Lamp1-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben megnöveli a LTR felhalmozódást a szomszédos kontroll sejtekhez képest, éheztetés hatására. (F) Regresszió analízis mutatja, hogy a LTR granulumok száma fordítottan arányos a sejtméret változással (klón/kontroll sejt arány). $R=0,32$, $R^2=0,101$, $p<0,001$. A görbe linearizált egyenlete: $\ln(y)=\ln(a)+b*\ln(x)$, ahol $a=-0,012\pm0,002$; $p<0,001$ és $b=1,015\pm0,002$; $p<0,001$. Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A-E) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

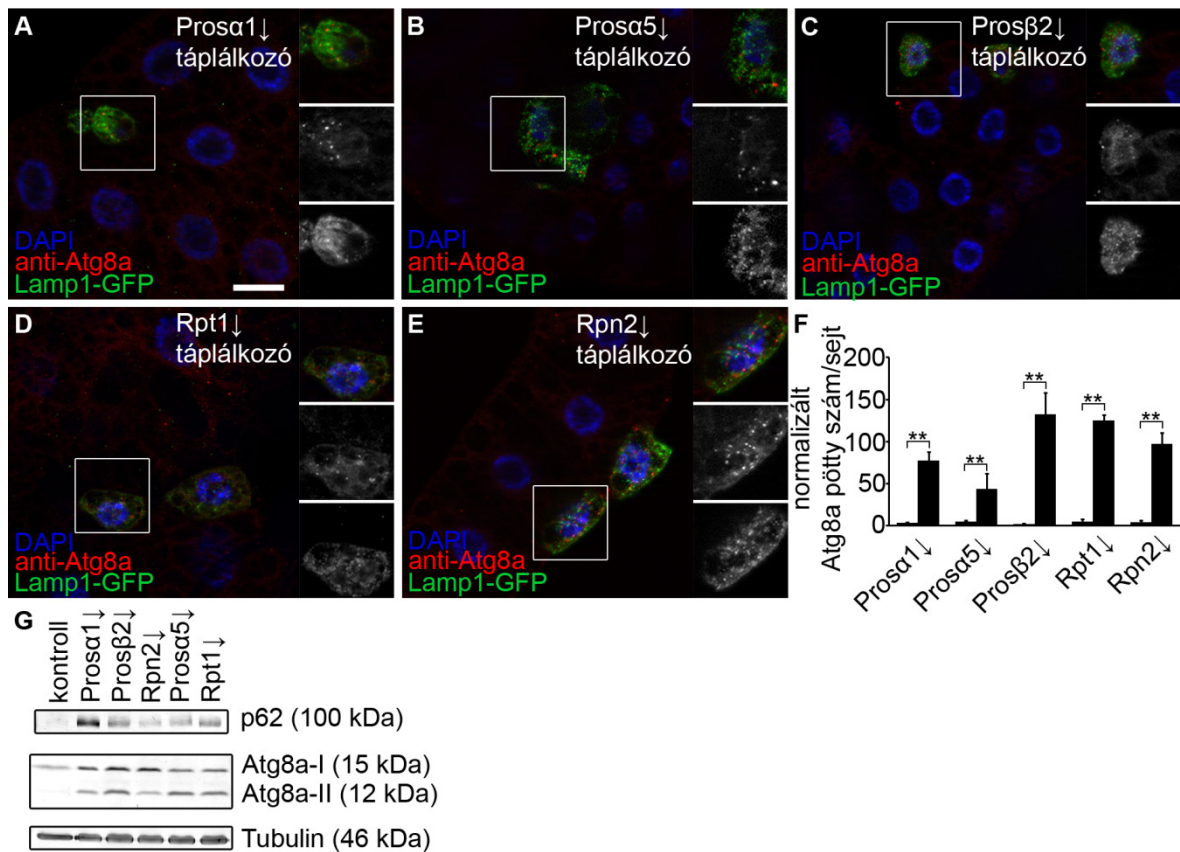
Az előzővel megegyező kísérletet megismételtük jól táplált lárvák vizsgálatával. Azt tapasztaltuk, hogy a Lamp1-GFP-vel jelölt klónsejtekben nagymértékben felhalmozódnak a LTR-el festődő granulumok (**22. ábra A-E**). Ez azt mutatja, hogy a proteaszóma inaktiváció sejt-autonóm módon indukál autofágiát. Statisztikailag is értékeltük az eredményeket: a klónsejtekben a LTR pöttyök száma minden esetben szignifikánsan eltért a szomszédos kontroll sejtektől (**22. ábra F**).



22. ábra A proteaszómális lebontás károsodása autofágiát indukál jól táplált *Drosophila* lárvák zsírtestében (A-E) A *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosβ2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi a Lamp1-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben LTR felhalmozódáshoz vezet jól táplált állatokban. (F) Különböző proteaszóma alegységek csendesítése szignifikánsan megnövekedett LTR felhalmozódást okoz jól táplált állatokban (** $p < 0,01$). Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A-E) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

Az LTR festések mellett anti-Atg8a immunfestést is alkalmaztunk. Az Atg8a specifikusan jelöli a korai autofág struktúrákat, autofagoszómákat. Proteaszóma RNSi hatására a Lamp1-GFP-vel jelölt klónsejtekben nagymértékben felhalmozódnak az Atg8a pozitív pöttyök, még hozzá sejt-autonóm módon (**23. ábra A-E**). Minden esetben szignifikás eltérést mutatott a statisztikai analízis (**23. ábra F**).

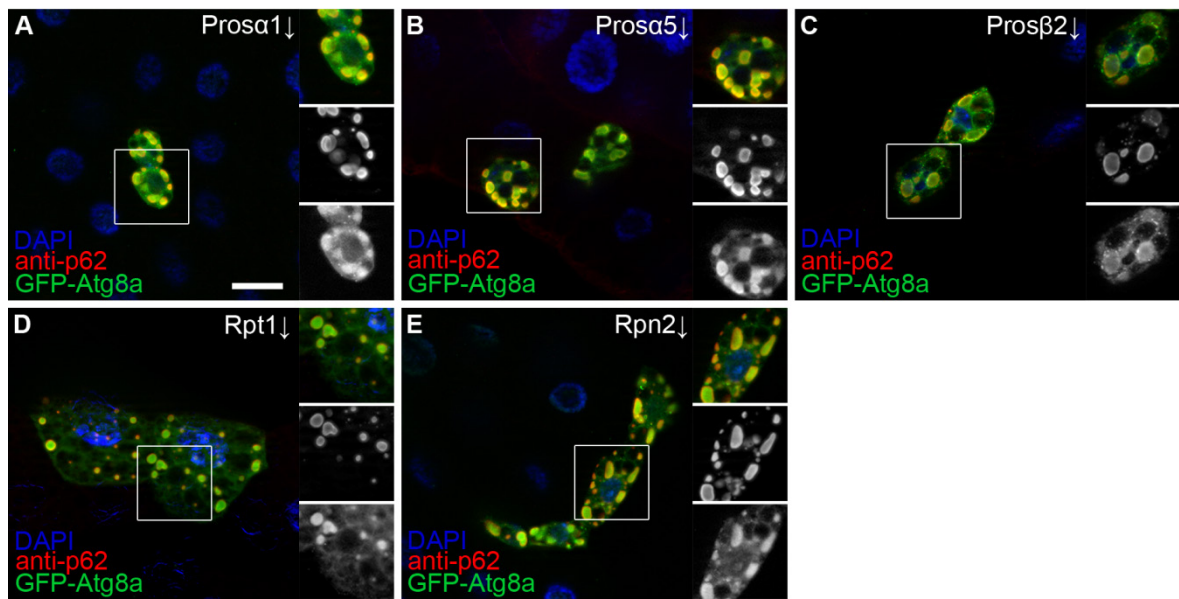
Western blot vizsgálattal is igazoltuk, hogy proteaszóma RNSi hatására megemelkedik az autofagoszómához kötődő lipidált Atg8a-II fehérje szintje jól táplált lárvákban (**23. ábra G**).



23. ábra Immunfestés és western blot is igazolja, hogy a proteaszóma inaktiváció autofágiát indukál jól táplált *Drosophila* lárvák zsírtestében (A-E) A *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosaβ2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi a Lamp1-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben Atg8a felhalmozódáshoz vezet jól táplált állatokban. (F) Különböző proteaszóma alegységek csendesítése szignifikánsan megnövekedett Atg8a felhalmozódást okoz jól táplált állatokban (** $p < 0,01$). (G) Western blot analízis mutatja, hogy a különböző proteaszóma alegységek csendesítése megnöveli a specifikus autofágia szállítmány p62, és az autofagoszómához kötődő, lipidált Atg8a-II fehérje szintjét jól táplált lárvákban. Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A-E) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

5.2.3. Különböző proteaszóma alegységek csendesítése citoplazmás aggregátumok felhalmozódásához vezet és növeli az autofág fluxot

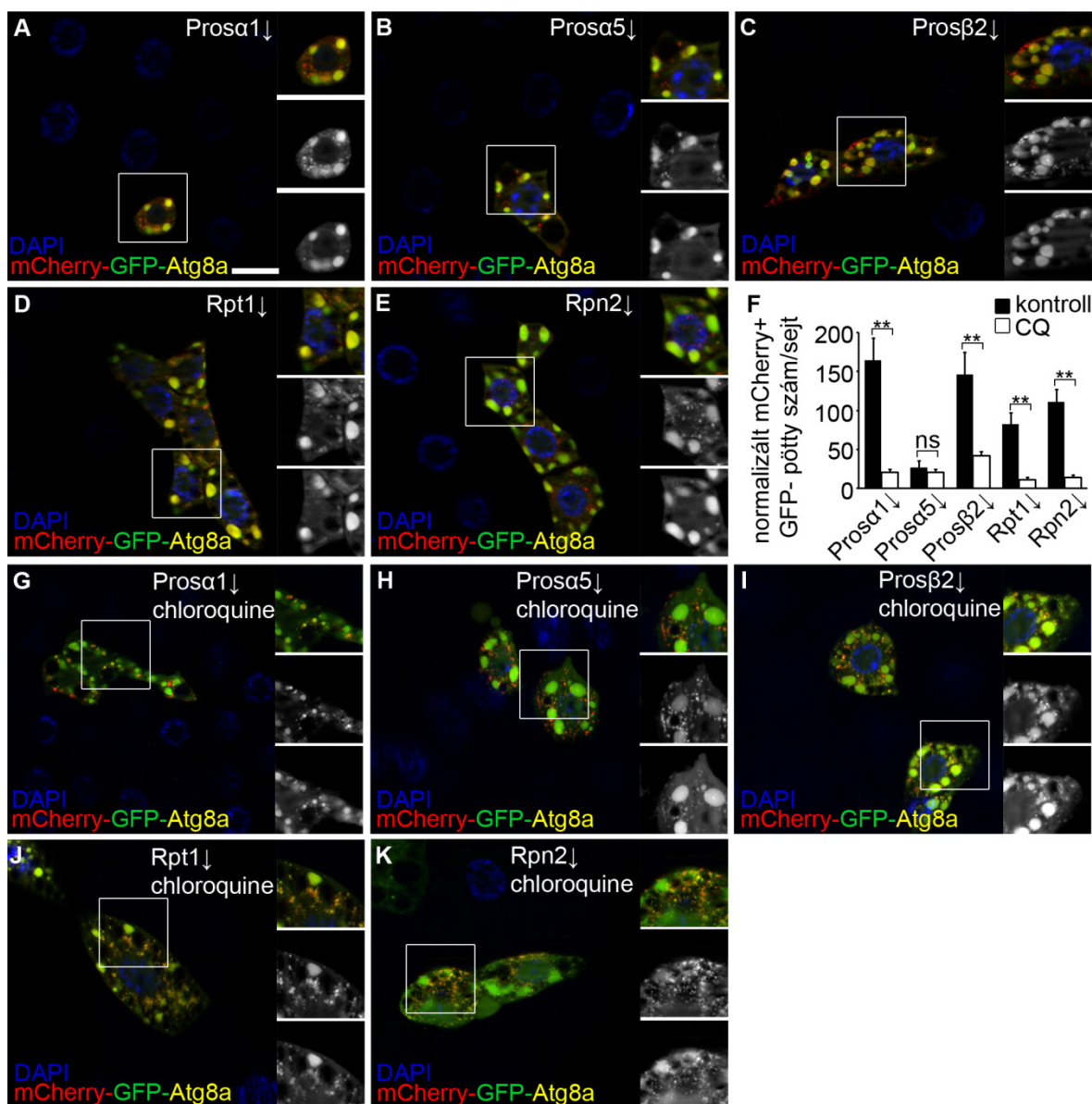
A túltermeltetett GFP-Atg8a riporter gyakran használt autofágia marker (Juhasz és mtsai, 2007; Juhasz és mtsai, 2008; Scott és mtsai, 2004). Proteaszóma RNSi sejtekben jelölte a kisméretű ($\approx 1 \mu\text{m}$) autofagoszómákat, emellett azonban kolokalizált a nagyméretű p62 pozitív fehérje aggregátumokkal is ($\approx 5 \mu\text{m}$) jól táplált lárvák zsírtestében (24. ábra A-E).



24. ábra Proteaszóma alegység csendesítés hatása a GFP-Atg8a autofágia riporter eloszlására (A-E) A *Prosα1* (A), *Prosα5* (B), *Prosβ2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi hatására a lárvális zsírtest klónsejtekben a GFP-Atg8a jelöli a kisméretű autofagoszómákat, és átfed a nagy p62 és ubiquitin tartalmú aggregátumokkal jól táplált állatokban. Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A-E) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

Az autofág flux kifejezés alatt azt a dinamikus folyamatot értjük, amikor az autofagoszómák létrejönnek, a lizoszómával fúzionálnak, majd beltartalmuk lebomlik. Autofág struktúrák felhalmozódhatnak a megnövekedett autofág indukció, vagy a lebontás hiánya miatt egyaránt. Ennek vizsgálatára a kettősen jelölt mCherry-GFP-Atg8a riportert használtuk (Kimura és mtsai, 2007). Ez a riporter szelektíven az autolizoszómákba jut, ahol a savas környezetben a GFP gyorsan inaktiválódik, míg az mCherry fluoreszcens marad. Proteaszóma alegység csendesítés hatására a sejtmag körül kis méretű, csak mCherry pozitív autolizoszómákat láthatunk, valamint nagy méretű, mCherry és GFP pozitív struktúrákat (**25. ábra A-E**), amelyeknek a mérete és eloszlása megegyezik az ubiquitin és p62 tartalmú aggregátumokkal. Ezzel szemben proteaszóma RNSi sejtekben chloroquine (egy nem specifikus lizoszóma gátlószer) kezelés hatására a kis mCherry pozitív struktúrák GFP-re is pozitívak, mivel nem inaktiválódik a GFP a lizoszómában (**25. ábra G-K**). Statisztikailag is kiértékeljük a változást: kezelés hatására ötből négy esetben szignifikánsan lecsökkent a csak mCherry pozitív lebontó autolizoszómák száma (**25. ábra F**). Tehát proteaszóma gátlás hatására az autofág indukció nő meg, nem pedig a lebontás gátlódik.

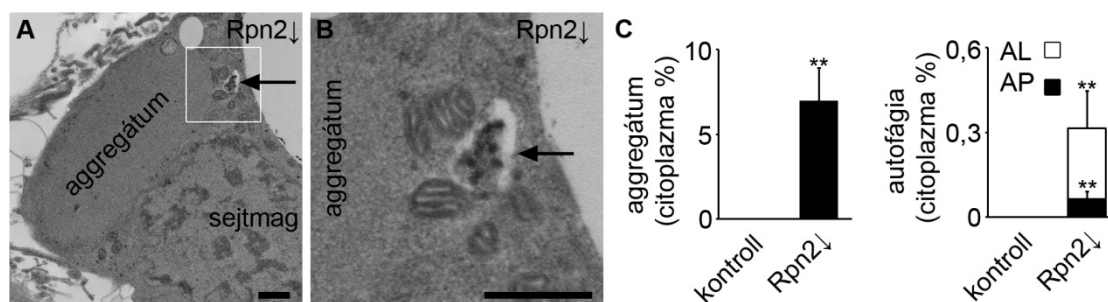
Ezek szerint a túltermeltetett GFP-Atg8a és az mCherry-GFP-Atg8a riporterek az ubiquitinált fehérjéket és p62-t tartalmazó aggregátumokba is bekerülnek, ellenben az endogén Atg8a-val, amely a nagy aggregátumokat nem, csak a kisméretű autofagoszómákat jelöli (23. ábra A-E).



25. ábra Proteaszóma alegység csendesítés hatása az mCherry-GFP-Atg8a autofág flux riporter eloszlására (A-E) A *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosa2* (C), *Rpt1* (D) és *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi hatására a lárvális zsírtest klónsejtekben perinukleárisan kis mCherry-vel jelölt autolizoszómák és elszórtan nagyméretű mCherry és GFP pozitív aggregátumok képződnek jól táplált állatokban. (F) A kontroll (A-E) és chloroquine kezelt (G-K) RNSi sejteknek statisztikai kiértékelése (** $p < 0,01$; ns: nem szignifikáns). (G-K) Chloroquine kezelés hatására a lizoszómában a GFP nem inaktiválódik, így az autofág struktúrák és az aggregátumok egyaránt GFP és mCherry pozitívak *Prosa1* (G), *Prosa5* (H), *Prosa2* (I), *Rpt1* (J) és *Rpn2* (K) proteaszóma alegység RNSi sejtekben. Méretvonal az

(A) panelen 20 μm (A-E, G-K) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

Elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk, hogy meggyőződjünk arról, hogy ezek a nagyméretű struktúrák valóban fehérje aggregátumok, és nem membránnal körülvett, megrekedt autofagoszómák/-lizoszómák. A proteaszóma alegység RNSi voanlakat cg-Gal4 driverrel kereszteztük, amely zsírtest-specifikus promótert (kollagén, cg) tartalmaz. Az L3 stádiumú jól táplált lárvák zsírtestéből készült metszeteket transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Az ultrastrukturális képek alapján megállapíthatjuk, hogy proteaszóma gátlás hatására zsírtest sejtekben megjelenő nagy fehérje aggregátumok nem membránnal határoltak. Ezen felül láthatunk lebontó autofagoszómákat és autolizoszómákat a jól táplált lárvák zsírtestében (26. ábra A-B), mint arra számítottunk a korábbi LTR és anti-Atg8a vizsgálatok alapján (22. ábra-23. ábra). Az ultrastrukturális képek statisztikai kiértékelése alapján szignifikánsan megnő az aggregátumok és autofág struktúrák teljes citoplazmához viszonyított aránya a kontrollhoz hasonlítva (26. ábra C).



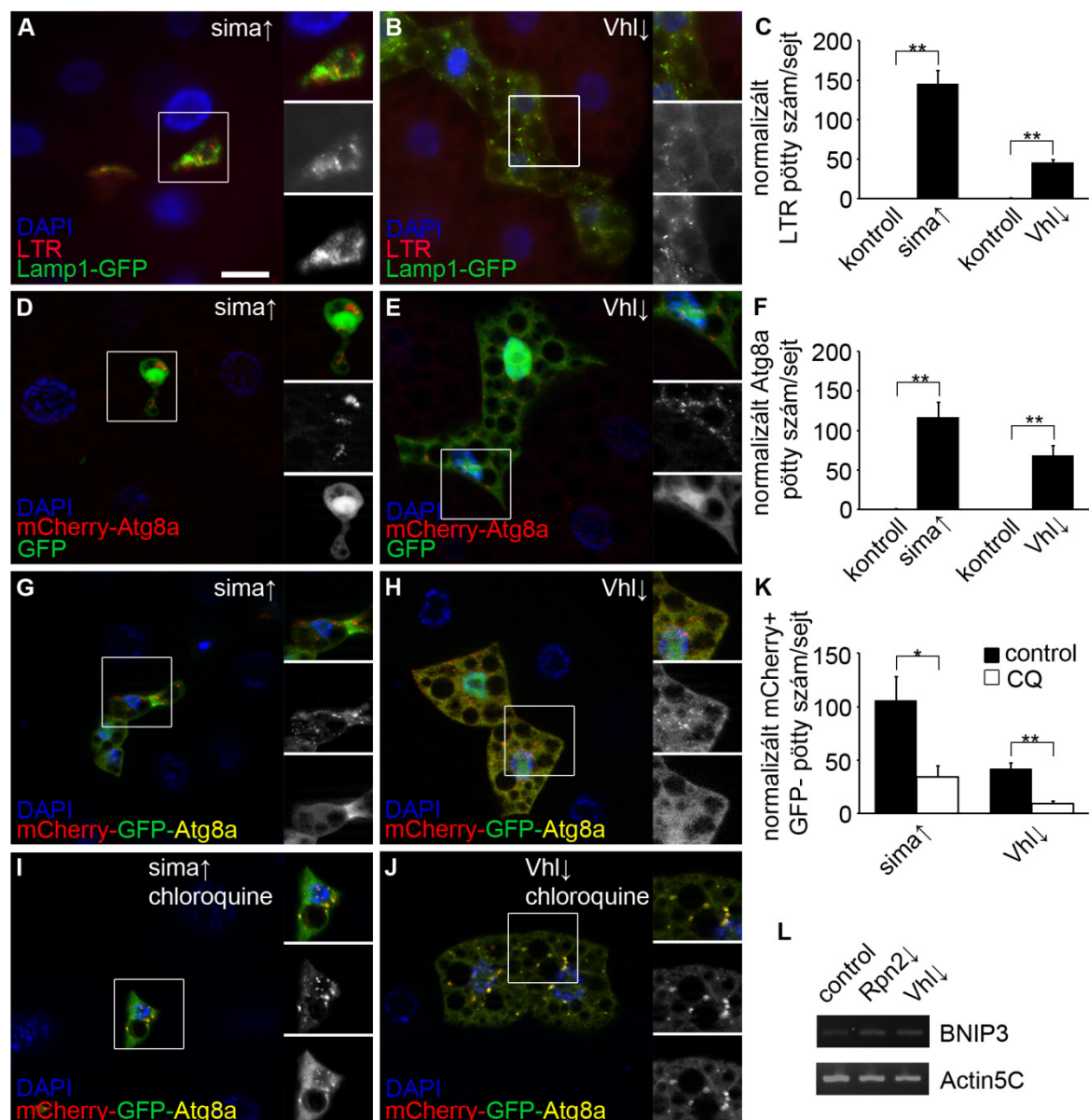
26. ábra Transzmissziós elektronmikroszkópia. (A) *Rpn2* RNSi hatására membránnal nem határolt fehérje aggregátumok és autolizoszómák (nyíl) halmozódnak fel jól táplált lárvák zsírtest sejtjeiben. A bekeretezett terület szerepel kinagyítva a (B) panelen. (C) Az ultrastrukturális képek statisztikai kiértékelése alapján az *Rpn2* RNSi sejtekben a citoplasma 7%-át teszik ki fehérje aggregátumok, míg a kettős membránnal határolt autofagoszómák (AP) és autolizoszómák (AL) a teljes terület 0,06 és 0,24%-át foglalják el (** $p < 0,01$). Méretvonal az (A) és (B) panelen 1 μm .

5.2.4. A hipoxia jelátvitel aktiválása autofágiát indukál *Drosophilában*

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer jól meghatározott szubsztrátja a HIF-1 transzkripciós faktor α alegysége, amely alacsony oxigén szint hatására aktiválódik. Ismert,

hogy a hipoxia autofágiát indukál emlős sejtekben, de ezt mindeddig *Drosophilában* nem vizsgálták. Az emlős HIF-1 α gén ortológia muslicában a *sima* (similar) (Lavista-Llanos és mtsai, 2002). Azt találtuk, hogy a *sima* túltermeltetése vagy a *Vhl* RNS interferencia LTR és Lamp1-GFP pozitív autolizoszómák kialakulásához vezetett lárvális zsírtest klónsejtekben (27. **ábra A-B**). A környező kontroll sejtekhez képest szignifikánsan megnőtt a LTR pöttyök száma mindkét esetben (27. **ábra C**). A *sima* túltermeltetés vagy a *Vhl* csendesítés hatására az autofagoszómákat és autolizoszómákat jelölő mCherry-Atg8a felhalmozódik a GFP-vel jelölt zsírtest klónsejtekben (27. **ábra D-E**). A szomszédos kontroll sejtekhez képest szignifikáns különbséget mutattunk ki statisztikai analízissel (27. **ábra F**). Ezután mCherry-GFP-Atg8a riportert használtunk, hogy az autofág fluxot is megvizsgáljuk. A *sima* túltermeltetés vagy *Vhl* RNSi esetén megjelenő autofág struktúrák nagy része csak mCherry pozitív volt (27. **ábra G, H**). Ha a lizoszómákat chloroquine kezeléssel gátoltuk, a struktúrák nagyrésze egyszerre GFP és mCherry pozitív lett (27. **ábra I, J**). Statisztikai értékelés kimutatta, hogy a chloroquine kezelés szignifikánsan lecsökkentette a csak mCherry-pozitív pöttyök számát (27. **ábra K**). Tehát a hipoxia jelátvitel genetikai bekapcsolása fokozza az autofág fluxot *Drosophilában*, nem pedig a lebontást gátolja.

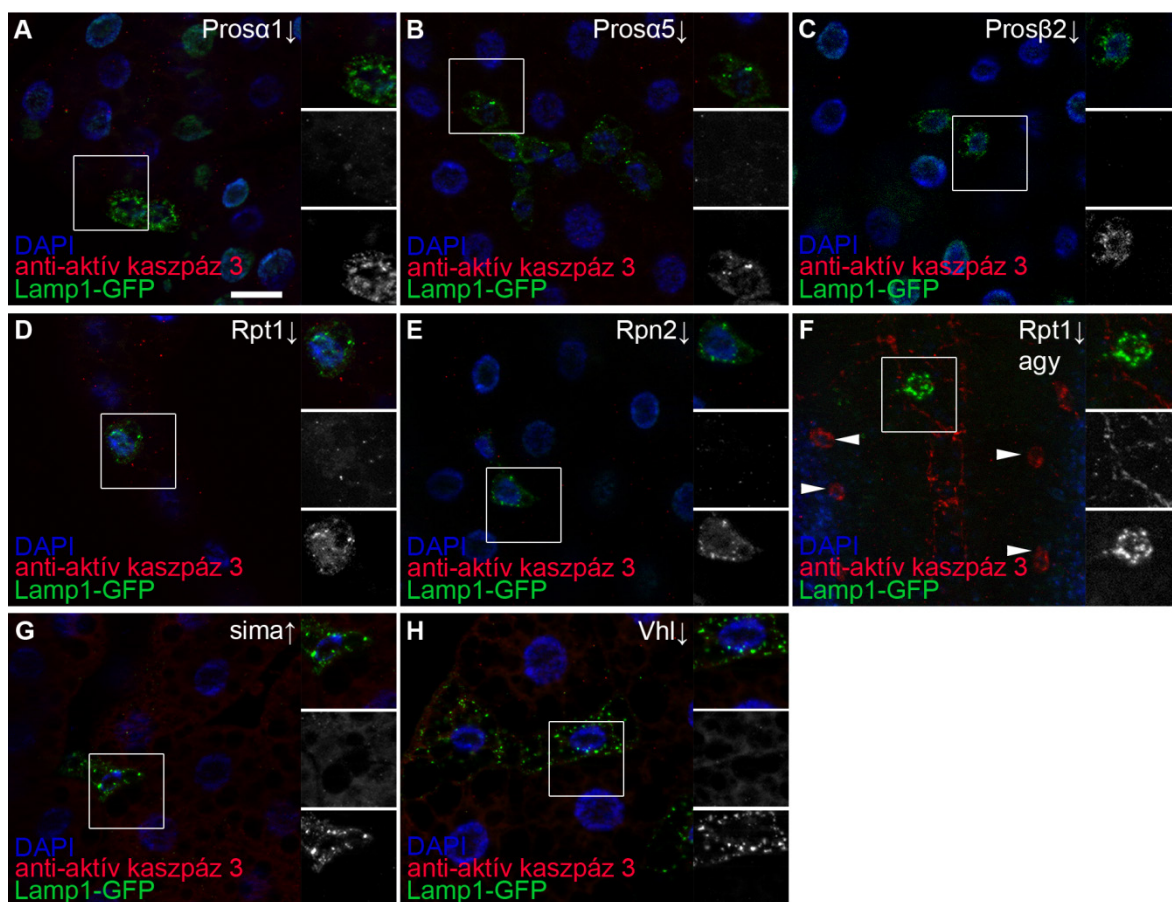
A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a proteaszóma alegység csendesítés hatására aktiválódik-e a hipoxia jelátvitel. Emlős sejtekben a BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) jól meghatározott célgénje a HIF-1 transzkripció faktornak (Bellot és mtsai, 2009), ám ezt muslicában még nem írták le. RT-PCR kísérlettel igazoltuk, hogy a *Drosophila* BNIP3 (CG5059) transzkripció szintje hasonló mértékben megnőtt *Rpn2* és *Vhl* RNS interferencia hatására a kontrollhoz képest (27. **ábra L**). Azaz a proteaszóma gátlás éppúgy aktiválta a BNIP3 transzkripciót, mint a hipoxia útvonal bekapcsolása.



27. ábra A hipoxia jelátvitel autofágiát indukál *Drosophila* lárvális zsírtestben (A-C)
A *sima* túltermeltetése (A) vagy a *Vhl* RNSi (B) LTR pozitív autolizoszómák indukciójához vezet jól táplált lárvák zsírtest klónsejtekben. Statisztikai kiértékelés a (C) panelen látható. (D-F) A *sima* túltermeltetése (D) vagy a *Vhl* csendesítése (E) az mCherry-Atg8a pozitív granulumok kialakulását serekeníti a GFP-vel jelölt zsírtest klónsejtekben jól táplált lárvákban. A statisztikai kiértékelés az (F) panelen látható. (G-J) A *sima* túltermeltetés (G) vagy a *Vhl* csendesítés (H) hatására kis mCherry pozitív struktúrák jelennek meg az mCherry-GFP-Atg8a riporterral vizsgálva. (I-J) A chloroquine kezelés gátolja a GFP autolizoszómális inaktiválását, így a *sima* túltermeltetés (I) vagy a *Vhl* csendesítés (J) GFP és mCherry pozitív struktúrák felhalmozódásához vezet. (K) A (G-J) panelek statisztikai értékelése (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (L) RT-PCR vizsgálat mutatja, hogy a BNIP3 transzkripció szintje megnő *Rpn2* és *Vhl* csendesítés hatására a kontrollhoz képest. Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A, B, D, E, G-J) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

5.2.5. A proteaszómális lebontás károsodása és a hipoxia jelátvitel indukció nem vezet apoptózishoz

A proteaszóma csendesítés a sejt szintjén gyakran nagyon kis sejtméretet és lekerekedett sejtalakot eredményezett, ezért felvetődött a kérdés, hogy ezek a sejtek vajon apoptózissal pusztulnak-e. Ennek vizsgálatára anti-aktív kaszpáz 3 immunfestést végeztünk. A kaszpáz 3 aktív formája az apoptózis effektor szakaszában szerepel, ezért használják apoptózis markerként. Nem tapasztaltunk anti-aktív kaszpáz 3 jelölést a proteaszóma alegység vagy *Vhl* csendesítés, vagy *sima* túltermeltetés hatására a Lamp1-GFP-vel jelölt zsírtest klónsejtekben (28. ábra A-E, G, H). Ellenben az agyban találtunk apoptózissal pusztuló sejteket, de ezek sem a Lamp1-GFP-vel jelölt *Rpt1* RNSi sejtek voltak (28. ábra F). Tehát a proteaszóma gátlás vagy a hipoxia jelátvitel indukciója nem vezet apoptózishoz lárvális zsírtest sejtekben.



28. ábra A proteaszómális lebontás károsodása nem vezet apoptózishoz (A-H) A Lamp1-GFP-vel jelölt *Prosa1* (A), *Prosa5* (B), *Prosb2* (C), *Rpt1* (D), *Rpn2* (E) proteaszóma alegység RNSi, *sima* overexpresszió (G) és *Vhl* RNSi (H) lárvális zsírtest

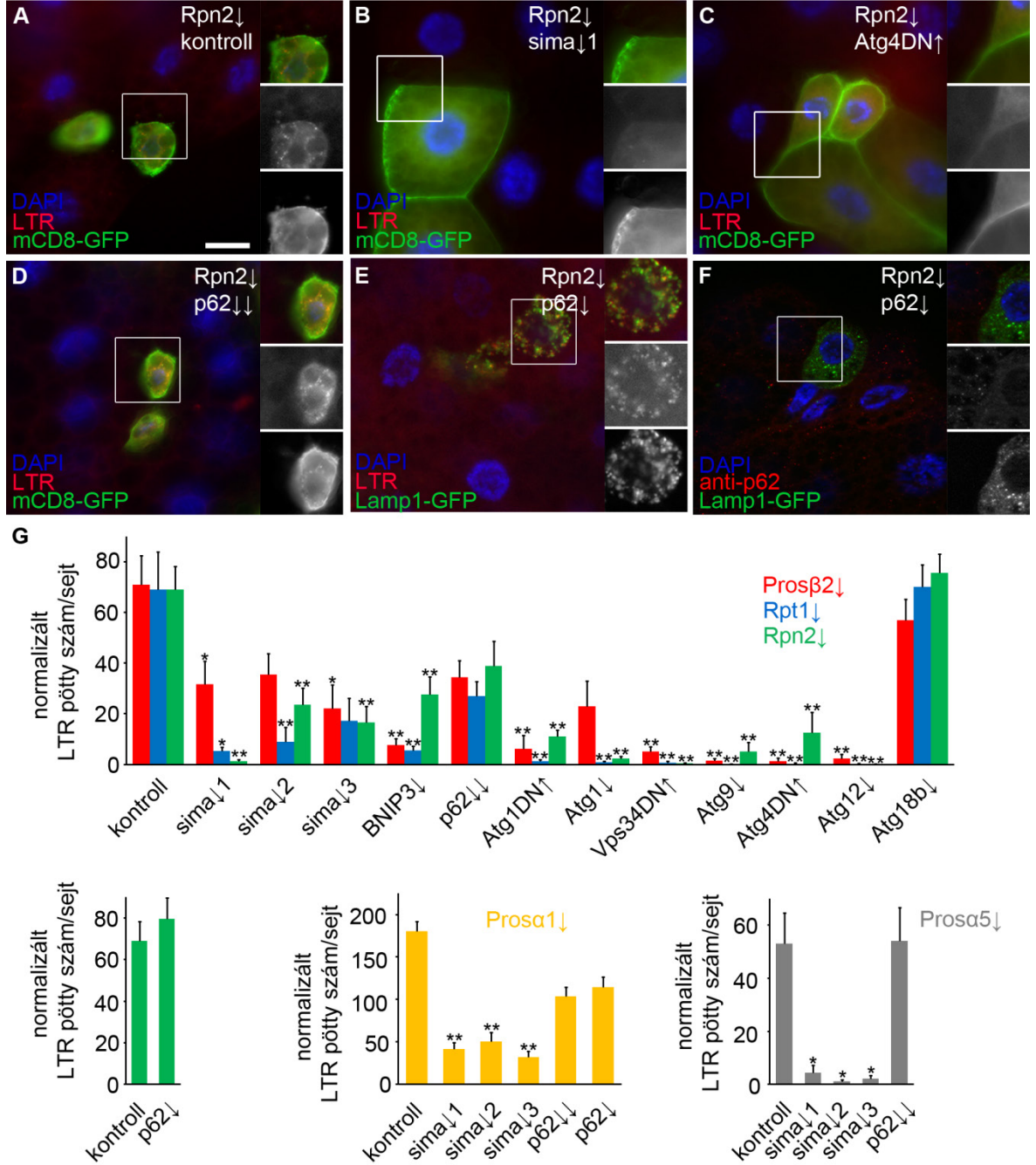
klónsejtekben nem tudtunk kimutatni anti-aktív kaszpáz 3 jelölést jól táplált állatokban. (F) Az agyban Lamp1-GFP-vel jelölt Rpt1 RNSi sejtekben sem tudtunk aktív kaszpáz 3 immunjelölést detektálni, ellenben számos kontroll sejt pozitív anti-aktív kaszpáz 3-ra. Méretvonal az (A) panelen 20 μ m (A-H) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

5.2.6. A proteaszóma gátlás indukálta autofágiához *Atg* gének és a *sima/Hif1 α* szükségesek

A választ keresve arra, hogy mely jelátviteli úton keresztül aktiválódik a kompenzáló autofágia, megvizsgáltuk a *sima*, a *p62* és a központi *Atg* gének szerepét. A hipoxia jelátvitel vizsgálatából származó eredményeink, miszerint a hipoxia út autofágiát indukál, illetve proteaszóma RNSi a BNIP3 transzkripciót aktiválja, felvetette a kérdést, hogy a proteaszóma gátlás aktiválta autofágia a hipoxia úton keresztül valósul-e meg. Ehhez kettős RNSi vizsgálatokban a LTR pötty számot értékeltük. A nagy számú kísérlethől csak egy-egy mikroszkópos képet emeltünk ki, az eredmények statisztikai kiértékelése az **29. ábra G** panelen látható, a pontos értékek a **2. függelékben** találhatóak.

A *Pro β 2*, *Rpt1* *Rpn2*, *Prosa1* és *Prosa5* proteaszóma alegység csendesítése LTR pozitív autolizoszómák felhalmozódásához vezet a mebránkötött mCD8-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben, jól táplált állatokban (**29. ábra A, G**). Három független *sima* transzgénikus RNSi konstrukt a 9 esetből 7-szer szignifikánsan gátolta a LTR festődést proteaszóma károsodás esetén (**29. ábra B, G**). A *BNIP3* hasonlóan gátolta a LTR jelölte autofágia indukciót (**29. ábra G**). Az *Atg1*, *Atg9* és *Atg12* csendesítés és a domináns negatív *Atg1*, *Vps34* és *Atg4* transzgének túltermeltetése gátolta a proteaszóma károsodás indukálta kompenzáló autofágiát (**29. ábra C, G**). Végül a *p62* szerepét vizsgáltuk már ismert *p62* transzgénikus RNSi vonalak felhasználásával (Pircs és mtsai, 2012). Két független *p62* RNSi együttes használatával, amelyek a gén különböző régióit célozzák meg, vagy egy harmadik független transzgénikus RNSi vonal segítségével sem sikerült statisztikailag szignifikáns mértékben csökkenteni a LTR festődést, ámbár körülbelül 60%-os csökkenést tapasztaltunk (**29. ábra D, E, G**). Amint azt vártuk, proteaszóma károsodás esetén a *p62* RNSi gátolta a *p62* pozitív fehérje aggregátumok kialakulását (**29. ábra F**). Negatív kontrollként az *Atg18b* RNSi-t használtuk, mivel ez a gén nem szükséges az éhezéssel indukált autofágia folyamatához sem *Drosophilában* (Scott és mtsai, 2004). Tehát a *sima*, és mind a négy nagy autofág fehérjekomplexe

tartozó központi *Atg* gének szükségesek az proteaszóma gátlás indukálta autofágia kialakulásához, azaz feltehetően a hipoxia jelátviteli úton keresztül kanonikus makroautofágiával valósul meg a kompenzáló autofágia.



29. ábra A proteaszóma károsodás indukálta autofágiához *Atg* gének és *sima/Hif1a* szükségesek (A) *Rpn2* csendesítés az mCD8-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben LTR felhalmozódáshoz vezet jól táplált állatokban. (B) *Rpn2* és *sima* kettős RNSi gátolja a LTR pozitív struktúrák kialakulását. (C) A domináns negatív (DN) *Atg4* túltermeltetése gátolja a LTR felhalmozódást az *Rpn2* RNSi klónsejtekben. (D,E) *Rpn2* és *p62* kettős RNSi nem gátolja a LTR pöttyök kialakulását két független RNSi együttes használata esetén (D)

és egy harmadik független *p62* RNSi esetén (E) a Lamp1-GFP-vel jelölt lárvális zsírtest klónsejtekben jól táplált állatokban. (F) A *p62* csendesítés gátolja a *p62* pozitív aggregátumok képződését *Rpn2* RNSi klónsejtekben. (G) *Prosβ2*, *Rpt1*, *Rpn2*, *Prosa1* és *Prosa5* RNSi sejtekben a LTR pötty szám/sejt statisztikai kiértékelése. *sima* (három független RNSi transzgén), *BNIP3*, *Atg1*, *Atg9*, *Atg12* csendesítése vagy domináns negatív *Atg1*, *Vps34*, *Atg4* túltermeltetése gátolja a proteaszóma károsodás indukálta autofágiát. A *p62* és a negatív kontroll *Atg18b* RNSi nem gátolta szignifikánsan az autofágia indukciót proteaszóma károsodás esetén. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Méretvonal az (A) panelen 20 μm (A-F) paneleken egyaránt. Jobb oldalon a bekeretezett részt nagyítottuk ki: mindhárom, piros és zöld csatorna.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az autofágia és az ubiquitin-proteaszóma rendszer közös feladata a sejten belüli minőség ellenőrzés és lebontás, így a homeodinamika fenntartása. Sokáig úgy vélték, hogy az UPS és az autofágia két független lebontó útvonal, ám mára számos publikáció igazolja, hogy szabályozásuk összefügg. A proteaszóma és az autofágia szubsztrátjai részben megegyeznek, így proteaszóma károsodás esetén kompenzáló autofágia indukálódhat. Neurodegeneratív betegségek esetén fehérjeaggregátum képződést írtak le, ami a nem megfelelő lebontás következménye. Leírták, hogy az autofágia mesterséges serkentése csökkenti a neurodegeneratív fenotípust az aggregátumok lebontása révén különféle modell rendszerekben (Lamark és Johansen, 2010; Korolchuk és mtsai, 2010; Wong és Cuervo, 2010). Az autofágia szabályozásának és mechanizmusának vizsgálatára egy teljes genom szűrést követően a két lebontó rendszer kapcsolatát kutattuk.

Az általunk elvégzett teljes genom szűrés egyedülálló, hiszen ilyen nagyszabású in vivo autofágia tesztet máig nem publikáltak. Hasonló vizsgálatokat is csak sejtenyészeten végeztek (Lipinski és mtsai, 2010), azonban jól ismert, hogy a sejtenyészeti kísérletekből levont következtetések nem minden esetben egyeznek meg az élő állaton tapasztaltakkal. A teljes genom szűrés során megvizsgáltunk 7397 transzgénikus UAS-RNSi vonalat, amely 7119 génnek felel meg és a humánban konzervált *Drosophila* gének 90%-át jelenti. Az elsődleges szűrés után maradt 1047 vonalból a másodlagos tesztekkel sikerült kiszűrni 213 RNSi törzset, amelyeket fenotípusuk alapján három csoportba osztottunk: AP (autofagoszóma), AL (autolizoszóma) és ATG (Atg gén-szerűek). A találatok között megtalálhatóak a központi Atg gének, valamint számos ismert autofágia jelátvitelben és szabályozásban részt vevő gén (pl.: Atg7, Vps34, TSC2, FOXO, stb.). Ezek mellett, körülbelül a találatok felének még nincs/nem volt leírva a szerepe az autofágia szabályozásban (pl. Syx17, Takats és mtsai, 2013). Közöttük van több öröklődő humán betegségben és tumorképződésben szerepet játszó gén is (pl.: Myc, Nagy és mtsai, 2013). A potenciális találatokat persze szükséges lesz validálni független RNSi vonalakkal és mutánsokkal (ha lehetséges), ezért a részletes lista bemutatásától a disszertációmban eltekintettem. További kísérletekkel lehetőség nyílik majd ezeknek az autofágiában eddig nem vizsgált gének funkciójának részletes megismerésére. Ezzel nem csak az autofágia mechanizmusának, az eukarióta sejt egyik fő lebontó folyamatának pontosabb

megismerése lehetséges, de humán betegségekhez köthető gének funkciója és autofág szerepe is, ami új terápiás lehetőségeket vethet fel.

A teljes genom szűrés találatai között felfigyeltünk a proteaszóma alegység vonalakra. A proteaszómális lebontás gátlása aggregátum képződéshez, ER stresszhez és sejthalálhoz vezet emlős és *Drosophila* sejtekben és csökkenti az élethosszt. Proteaszóma gátlószereket (pl. Bortezomib) multiple myeloma betegek kezelésére is használnak a klinikumban, mivel a rákos sejtek apoptózissal történő pusztulását okozza (Velentzas és mtsai, 2013; Suraweera és mtsai, 2012; Velentzas és mtsai, 2011; McPhee és mtsai, 2013). Noha mi nem tapasztaltunk apoptózist a különböző proteaszóma alegység csendesítés vagy a hipoxia jelátvitel genetikai aktiválása hatására *Drosophila* zsírtest sejtekben, de kis sejtméret és a bazális és az éheztetéssel indukált autofágia fokozódása egyértelmű volt. Ez az indukció a kanonikus makroautofágia útvonalon, az *Atg1*, *Vps34*, *Atg9*, *Atg4* és *Atg12* génektől függő módon valósul meg.

A vizsgálatok egyik fontos következtetése, hogy a gyakran használt, túltermeltetett fluoreszcens Atg8 riporterek nem alkalmasak az autofágia vizsgálatára proteaszóma gátlás esetén, mivel a felhalmozódó p62 tartalmú aggregátumokban felgyűlnek. Feltehetőleg azért, mert a p62 specifikusan köti az Atg8-at LIR doménjén keresztül. Ez a műtermék hibás következtetésekhez vezethet, éppúgy mint a p62 és Atg8 riporterek együttes túltermeltetése esetén (Pircs és mtsai, 2012).

Az eredmények felvetették a kérdést, hogy milyen úton aktiválódik a kompenzáló autofágia proteaszóma károsodás esetén. Több útvonal is elképzelhető, amelyek párhuzamosan hathatnak. Az egyik lehetőség, hogy a fehérjeaggregátum felhalmozódás következménye az autofagoszóma képződés. A specifikus autofág szubsztrátok, mint a p62 és a blue cheese (a humán Alf *Drosophila* homológja) túltermeltetése azonban nem okoz autofágia indukciót (Pircs és mtsai, 2012; Simonsen és mtsai, 2007). Ezzel összhangban a p62 nem szükséges a túléléshez és az éheztetéssel indukált autofágiához knockout egerekben (Komatsu és mtsai, 2007). Több egyéb szelektív autofágia receptor is ismert emlős sejtekben, közülük a HDAC6-ot (Pandey és mtsai, 2007) és a blue cheese-t (Simonsen és mtsai, 2007) vizsgálták részletesen a p62 mellett (Johansen és Lamark, 2011). Kísérleteink azt mutatták, hogy a p62 nem szükséges a proteaszóma károsodás esetén indukált autofágiához.

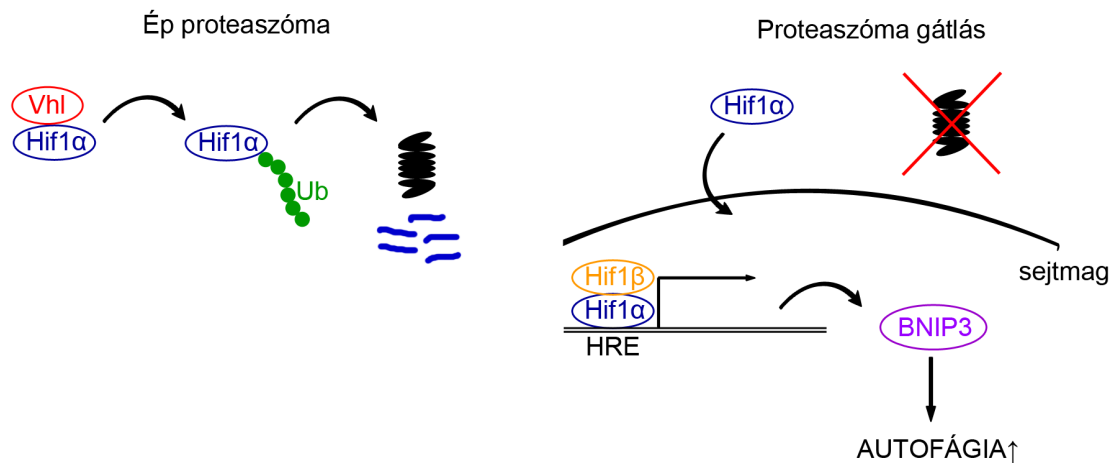
Egy másik hipotézis szerint a proteaszómális lebontás legfőbb feladata az intracelluláris szabad aminosav szint fenntartása. A proteaszóma gátlás esetén aktiválódó

autofágiát az aminosav hiány is indukálhatja (Suraweera és mtsai, 2012). Az aminosavak pótlásával az autofágia indukció csökkenthető élesztő és emlős sejtekben, valamint a lecsökkent élethossz részben visszaállítható *Drosophilában* proteaszóma gátlás esetén. A sejtek ilyenkor talán tolerálni tudják a fehérjeaggregátumok felhalmozódását, de az aminosav hiányt nem. Ebben az esetben az autofágia és az UPS együttes gátlása tovább csökkentené az aminosav szintet, ami a sejtnövekedést még inkább gátolná. *Drosophila* zsírtest sejtklónokon végzett vizsgálataink során viszont nem tapasztaltunk további sejtméret csökkenést proteaszóma alegységek és a központi autofágia gének együttes csendesítése esetén. Így feltehetőleg az aminosav szint nem az egyetlen kapocs az autofágia és az UPS között.

A harmadik elképzelés, hogy a proteaszóma gátlásával bizonyos szubsztrátjai stabilizálódnak, amelyek az autofágiát serkentik. Normál körülmények között egy prolin hidroxiláz hidroxilálja a Hif1 α -t, amit a Vhl felismer, így ubiquitinálja és proteaszómális lebontásra irányítja. Azaz a Hif1 α sejten belüli szintje alacsony, mivel folyamatosan termelődik és le is bomlik. Alacsony oxigén szint esetén a Hif1 α stabilizálódik, a sejtmagba kerül, ahol a Hif1 β -val heterodimer transzkripciós faktort alkot és számos gén átírását serkenti, amelyek a hipoxia túlélésében nélkülözhetetlenek. A hipoxia autofágiát indukál normál és tumoros emlős sejtekben a HIF-1 transzkripciós faktor révén, a BNIP3 és BNIP3L target géneken keresztül (Bellot és mtsai, 2009; Zhang és mtsai, 2008; Nys és mtsai, 2011). A hipoxia indukálta autofágia a tumoros sejtek túlélését is elősegíti a tumor középső, rossz oxigén ellátottságú részein. Kísérleteink azt mutatták, hogy a hipoxia jelátvitel aktiválása autofágiát indukál *Drosophila* zsírtest sejtekben és megnöveli a BNIP3 transzkripciót. Proteaszóma károsodás esetén is hasonló mértékben megemelkedett a BNIP3 mRNS szint. A proteaszóma alegység RNSi hatására indukálódó kompenzáló autofágia mértékét csökkentette a *sima* (a Hif1 α ortológja) és a *BNIP3* csendesítése. Tehát az eredményeink arra utalnak, hogy a proteaszóma károsodás hatására indukálódó autofágia a hipoxia (*sima*, BNIP3) útvonalon keresztül valósul meg, feltehetőleg más útvonalakkal kiegészülve (**30. ábra**).

Egy újkeletű, vese tumorok teljes exom szekvenálásán alapuló vizsgálat során az ubiquitin-proteaszóma rendszer gyakori mutációját tapasztalták, amit a Hif1 α és a Hif2 α overexpressziója kísért (Guo és mtsai, 2012). Számos különböző tumorban mutattak ki magasabb autofágia szintet, valamint több onkogén és tumor szupresszor gén (pl. Vhl) kódol az ubiquitin konjugációban szerepet játszó enzimet (Kirkin és Dikic, 2011).

Mindezek és saját eredményeink alapján lehetséges, hogy az UPS károsodás részben a hipoxia jelátvitelen át aktiválja az autofágiát normál oxigén ellátottság mellett bizonyos tumoros sejtekben.



30. ábra Az eredmények sematikus összefoglalása. A Hif1 α normál körülmények között folyamatosan termelődik és le is bontja a proteaszóma, mivel a Vhl ubiquitinálja. Proteaszóma gátlás esetén a Hif1 α bekerül a sejtmagba, ahol a Hif1 β -val aktív transzkripciós faktort alkot. A HRE szekvenciához kötődve számos hipoxia válaszbán részt vevő gén átírását serkenti, közöttük a BNIP3-ét is. A proteaszóma károsodás indukálta kompenzáló autofágiát feltehetőleg legalábbis részben a BNIP3 aktiválja.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az eukarióta sejtekben a felépítő és lebontó folyamatok egyensúlya teremti meg a homeodinamikát. A szabályozott lebontás két fő útja az evolúciósan konzervált autofágia és az ubiquitin-proteaszóma rendszer. Munkánk első felének célja az volt, hogy az autofágia szabályozását részletesebben megismerjük, és új autofágia géneket írjunk le. A második felében az autofág és proteaszómális lebontás kapcsolatát vizsgáltuk. Ismert, hogy a két rendszer nem független egymástól, kapcsolatukra több hipotézis létezik, azonban pontos részletei még felderítésre várnak.

Az autofágia szabályozásának és mechanizmusának tanulmányozására egy *in vivo* teljes genom szűrést végeztünk, amely során szomatikus RNS interferencia sejtklónokat vizsgáltunk *Drosophila* lárvák zsírtestében. 7397 RNS interferencia vonal elsődleges szűrése után több másodlagos tesztet végeztünk el. Vizsgáltuk az alapszintű és éheztetéssel indukált autofágia és az autofág flux mértékét fluoreszcens Atg8 riporterekkel, Lysotracker Red festéssel és p62 immunfestéssel. A találatok között szerepeltek központi autofágia gének, az autofágia szabályozásában már leírt, valamint még nem vizsgált gének. Közöttük vannak olyan, különféle betegségekben részt vevő gének, amelyeknek autofágiában betöltött szerepét máig nem kutatták.

A ubiquitin-proteaszóma rendszer és autofágia kapcsolatának vizsgálatára különböző proteaszóma alegység RNS interferencia *Drosophila* vonalak lárvális zsírtestét vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a proteaszómális lebontás genetikai gátlása kompenzáló autofágiát indukál, amelyhez szükségesek a központi Atg gének (*Atg1*, *Vps34*, *Atg9*, *Atg4* és *Atg12*), azaz a kanonikus makroautofágia úton valósul meg. A proteaszóma károsodás nagymértékű fehérje felhalmozódáshoz vezet. Ezek az aggregátumok ubiquitinált fehérjéket és a p62 szelektív autofágia receptort is tartalmazták, azonban a p62 nem volt szükséges az indukálódó autofágiához.

Kimutattuk, hogy a hipoxia jelátvitel genetikai aktiválása autofágiát indukál *Drosophilában*. A proteaszóma jól ismert szubsztrátja a HIF-1 α /sima. Eredményeink alapján a proteaszóma gátlás hatására aktiválódó autofágia a sima/BNIP3 útvonalon keresztül indukálódhat.

Eredményeink és humán sejteken végzett újkeletű vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a proteaszóma gátlás a hipoxia jelátvitelen át aktiválhatja az autofágiát bizonyos vesetumor sejtekben is.

8. SUMMARY

The balance of synthesis and degradation maintains the homeodynamics observed in eukaryotic cells. Two pathways are responsible for the majority of regulated protein catabolism: lysosomal self-degradation through autophagy, and the ubiquitin-proteasome system (UPS). The aim of the first part of our work was to gain new insights into autophagy regulation, and to identify new genes involved in autophagy. In the second part, we investigated the cross-talk between autophagy and proteasomal degradation. Recent observations suggested a tight interaction between these degradative routes, but the molecular links are poorly characterized.

To gain further insight into the molecular mechanisms and regulation of autophagy, we carried out an *in vivo* whole-genome RNAi screen. In the primary screen we tested the effect of 7397 RNAi strains in mosaic fat bodies of starved *Drosophila* larvae, and we performed several secondary screens. We investigated basal and starvation-induced autophagy and autophagic flux with fluorescent Atg8 reporters, LysoTracker Red staining and p62 immunostaining. We identified most known autophagy genes, regulators and also new, so far unpublished candidates, some of which are involved in various human diseases.

To study the connection between autophagy and UPS, we tested different proteasome subunit (α , β or regulatory) RNAi effects in somatic clones of larval fat body cells in *Drosophila*. We showed that compensatory autophagy is enhanced by the genetic inactivation of proteasomal degradation. Proteasome inhibition induces canonical macroautophagy, as it depended on core autophagy genes *Atg1*, *Vps34*, *Atg9*, *Atg4* and *Atg12*. Large-scale accumulation of aggregates containing p62 and ubiquitinated proteins was observed in proteasome RNAi cells, but p62 was not required for autophagy induction.

One of the best characterized substrates of UPS is HIF-1 α /sima. Hypoxia is a known trigger of autophagy in mammalian cells, and we showed that genetic activation of hypoxia signalling also induces autophagy in *Drosophila*. Moreover, we found that proteasome inactivation-induced autophagy requires sima and BNIP3.

The importance of our work is underscored by a recent report, showing that mutations affecting genes encoding UPS enzymes can be genetically linked to renal cancer, characterized by elevated hypoxia signalling, which may lead to induction of autophagy.

9. IRODALOM

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleeb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.

- O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. és Venter, J. C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287(5461): 2185-95.
- Arrigo, A. P., Tanaka, K., Goldberg, A. L. és Welch, W. J. (1988) Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331(6152): 192-4.
- Ashburner, M., Golic, K. G. és Hawley, R. S. (2005). *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bartlett, B. J., Isakson, P., Lewerenz, J., Sanchez, H., Kotzebue, R. W., Cumming, R. C., Harris, G. L., Nezis, I. P., Schubert, D. R., Simonsen, A. és Finley, K. D. (2011) p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy* 7(6): 572-83.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. és Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92(3): 367-80.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J. és Mazure, N. M. (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29(10): 2570-81.
- Brand, A. H. és Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118(2): 401-15.
- Chang, Y. Y. és Neufeld, T. P. (2009) An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell* 20(7): 2004-14.
- Chen, Y. és Klionsky, D. J. (2011) The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* 124(Pt 2): 161-70.
- Cook, C. és Petrucelli, L. (2009) A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792(7): 664-75.
- Di Fiore, P. P., Polo, S. és Hofmann, K. (2003) When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6): 491-7.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. és Dickson, B. J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448(7150): 151-6.
- Duffy, J. B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34(1-2): 1-15.

- Elliott, D. A. és Brand, A. H. (2008) The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol Biol* 420: 79-95.
- Erdi, B., Nagy, P., Zvara, A., Varga, A., Pircs, K., Menesi, D., Puskas, L. G. és Juhasz, G. (2012) Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy* 8(7): 1124-35.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. és Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11.
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. és Ptashne, M. (1988) GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332(6167): 853-6.
- Gannage, M. és Munz, C. (2010) MHC presentation via autophagy and how viruses escape from it. *Semin Immunopathol* 32(4): 373-81.
- Geng, J. és Klionsky, D. J. (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9(9): 859-64.
- Gilon, T., Chomsky, O. és Kulka, R. G. (1998) Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17(10): 2759-66.
- Golic, K. G. és Lindquist, S. (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59(3): 499-509.
- Groettrup, M., Kirk, C. J. és Basler, M. (2010) Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 10(1): 73-8.
- Guo, G., Gui, Y., Gao, S., Tang, A., Hu, X., Huang, Y., Jia, W., Li, Z., He, M., Sun, L., Song, P., Sun, X., Zhao, X., Yang, S., Liang, C., Wan, S., Zhou, F., Chen, C., Zhu, J., Li, X., Jian, M., Zhou, L., Ye, R., Huang, P., Chen, J., Jiang, T., Liu, X., Wang, Y., Zou, J., Jiang, Z., Wu, R., Wu, S., Fan, F., Zhang, Z., Liu, L., Yang, R., Liu, X., Wu, H., Yin, W., Zhao, X., Liu, Y., Peng, H., Jiang, B., Feng, Q., Li, C., Xie, J., Lu, J., Kristiansen, K., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Wang, J., Yang, H., Cai, Z. és Wang, J. (2012) Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* 44(1): 17-9.
- Hammond-Martel, I., Yu, H. és Affar el, B. (2012) Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation. *Cell Signal* 24(2): 410-21.

- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. és Mizushima, N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095): 885-9.
- Hart, L. S., Cunningham, J. T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S. L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A. E., Koong, A., Fuchs, S. Y., Diehl, J. A., Mills, I. G., Ruggero, D. és Koumenis, C. (2012) ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest* 122(12): 4621-34.
- He, C. és Klionsky, D. J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43: 67-93.
- Hershko, A. és Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-79.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 195-201.
- Hisamatsu, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K. B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahashi, N., Tamura, T., Ichihara, A. és Tanaka, K. (1996) Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med* 183(4): 1807-16.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. és Bunn, H. F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 7987-92.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C. és Mizushima, N. (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151(6): 1256-69.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. és Kaelin, W. G., Jr. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292(5516): 464-8.
- Jaeger, P. A. és Wyss-Coray, T. (2009) All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* 4: 16.
- Johansen, T. és Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7(3): 279-96.

- Juhasz, G., Csikos, G., Sinka, R., Erdelyi, M. és Sass, M. (2003) The *Drosophila* homolog of Atg1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett* 543(1-3): 154-8.
- Juhasz, G., Erdi, B., Sass, M. és Neufeld, T. P. (2007) Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 21(23): 3061-6.
- Juhasz, G., Hill, J. H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E. H., Backer, J. M. és Neufeld, T. P. (2008) The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Biol* 181(4): 655-66.
- Jung, T. és Grune, T. (2012) Structure of the proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci* 109: 1-39.
- Ke, Q. és Costa, M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70(5): 1469-80.
- Kimura, S., Noda, T. és Yoshimori, T. (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3(5): 452-60.
- Kirkin, V. és Dikic, I. (2011) Ubiquitin networks in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 21(1): 21-8.
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjorkoy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J. P., Overvatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I. és Johansen, T. (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 33(4): 505-16.
- Kisselev, A. F. és Goldberg, A. L. (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8(8): 739-58.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. és Ohsumi, Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5(4): 539-45.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. és Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095): 880-4.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. és Tanaka, K. (2007)

- Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131(6): 1149-63.
- Konstantinova, I. M., Tsimokha, A. S. és Mittenberg, A. G. (2008) Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* 267: 59-124.
- Korolchuk, V. I., Menzies, F. M. és Rubinsztein, D. C. (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett* 584(7): 1393-8.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhi, T. és Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432(7020): 1032-6.
- Kuusisto, E., Suuronen, T. és Salminen, A. (2001) Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 223-8.
- Lamark, T. és Johansen, T. (2010) Autophagy: links with the proteasome. *Curr Opin Cell Biol* 22(2): 192-8.
- Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J. és Wappner, P. (2002) Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol Cell Biol* 22(19): 6842-53.
- Lipinski, M. M., Hoffman, G., Ng, A., Zhou, W., Py, B. F., Hsu, E., Liu, X., Eisenberg, J., Liu, J., Blenis, J., Xavier, R. J. és Yuan, J. (2010) A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Dev Cell* 18(6): 1041-52.
- Liu, X. D., Ko, S., Xu, Y., Fattah, E. A., Xiang, Q., Jagannath, C., Ishii, T., Komatsu, M. és Eissa, N. T. (2012) Transient aggregation of ubiquitinated proteins is a cytosolic unfolded protein response to inflammation and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 287(23): 19687-98.
- Majeski, A. E. és Dice, J. F. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2435-44.
- McPhee, C. K., Balgley, B. M., Nelson, C., Hill, J. H., Batlevi, Y., Fang, X., Lee, C. S. és Baehrecke, E. H. (2013) Identification of factors that function in *Drosophila* salivary gland cell death during development using proteomics. *Cell Death Differ* 20(2): 218-25.

- Melendez, A. és Neufeld, T. P. (2008) The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135(14): 2347-60.
- Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H. és Levine, B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638): 1387-91.
- Mizushima, N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1535-41.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21(22): 2861-73.
- Mizushima, N. és Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147(4): 728-41.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. és Klionsky, D. J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069-75.
- Mohr, S. E. és Perrimon, N. (2011) RNAi screening: new approaches, understandings, and organisms. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(2): 145-58.
- Mori, H., Kondo, J. és Ihara, Y. (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235(4796): 1641-4.
- Moscat, J. és Diaz-Meco, M. T. (2012) p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci* 37(6): 230-6.
- Mummery-Widmer, J. L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B. J. és Knoblich, J. A. (2009) Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458(7241): 987-92.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y. és Tanaka, K. (2007) Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316(5829): 1349-53.
- Nagy, P., Varga, A., Piracs, K., Hegedus, K. és Juhasz, G. (2013) Myc-Driven Overgrowth Requires Unfolded Protein Response-Mediated Induction of Autophagy and Antioxidant Responses in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 9(8): e1003664.
- Naujokat, C. és Hoffmann, S. (2002) Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82(8): 965-80.
- Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H. és Brech, A. (2008) Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster*

- homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol* 180(6): 1065-71.
- Ni, J. Q., Liu, L. P., Binari, R., Hardy, R., Shim, H. S., Cavallaro, A., Booker, M., Pfeiffer, B. D., Markstein, M., Wang, H., Villalta, C., Lavery, T. R., Perkins, L. A. és Perrimon, N. (2009) A *Drosophila* resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics* 182(4): 1089-100.
- Ni, J. Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L. P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H. S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., Binari, R., Booker, M., Brennecke, J., Perkins, L. A., Hannon, G. J. és Perrimon, N. (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat Methods* 8(5): 405-7.
- Nys, K., Maes, H., Dudek, A. M. és Agostinis, P. (2011) Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1alpha in skin carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1816(1): 1-12.
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., DiProspero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D. L., Garza, D., Hubbert, C. C., Yao, T. P., Baehrecke, E. H. és Taylor, J. P. (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447(7146): 859-63.
- Pircs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K. és Juhasz, G. (2012) Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS One* 7(8): e44214.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D. és Baulcombe, D. C. (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276(5318): 1558-60.
- Ravid, T. és Hochstrasser, M. (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9): 679-90.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J. és Rubinsztein, D. C. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36(6): 585-95.
- Reed, S. I. (2006) The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl Cell Differ* 42: 147-81.

- Rusten, T. E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P. O., Brech, A. és Stenmark, H. (2004) Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 7(2): 179-92.
- Rusten, T. E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L. M., Nezis, I. P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J. P., Brech, A., Bilder, D. és Stenmark, H. (2007) ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* 17(20): 1817-25.
- Sarraf, S. A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Huttlin, E. L., Gygi, S. P. és Harper, J. W. (2013) Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496(7445): 372-6.
- Schmid, D., Pypaert, M. és Munz, C. (2007) Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26(1): 79-92.
- Scott, R. C., Juhasz, G. és Neufeld, T. P. (2007) Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* 17(1): 1-11.
- Scott, R. C., Schuldiner, O. és Neufeld, T. P. (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* 7(2): 167-78.
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D. R. és Finley, K. D. (2008) Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* 4(2): 176-84.
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Lindmo, K., Galaviz, V., Cheng, S., Rusten, T. E. és Finley, K. D. (2007) Genetic modifiers of the *Drosophila* blue cheese gene link defects in lysosomal transport with decreased life span and altered ubiquitinated-protein profiles. *Genetics* 176(2): 1283-97.
- Sorokin, A. V., Kim, E. R. és Ovchinnikov, L. P. (2009) Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)* 74(13): 1411-42.
- Suraweera, A., Munch, C., Hanssum, A. és Bertolotti, A. (2012) Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Mol Cell* 48(2): 242-53.
- Takats, S., Nagy, P., Varga, A., Pircs, K., Karpati, M., Varga, K., Kovacs, A. L., Hegedus, K. és Juhasz, G. (2013) Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J Cell Biol* 201(4): 531-9.
- Tanaka, K. (1994) Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol* 56(5): 571-5.

- Tanaka, K., Mizushima, T. és Saeki, Y. (2012) The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem* 393(4): 217-34.
- Toh, P. P., Luo, S., Menzies, F. M., Rasko, T., Wanker, E. E. és Rubinsztein, D. C. (2013) Myc inhibition impairs autophagosome formation. *Hum Mol Genet*.
- Tomaru, U., Ishizu, A., Murata, S., Miyatake, Y., Suzuki, S., Takahashi, S., Kazamaki, T., Ohara, J., Baba, T., Iwasaki, S., Fugo, K., Otsuka, N., Tanaka, K. és Kasahara, M. (2009) Exclusive expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in the human thymic cortex. *Blood* 113(21): 5186-91.
- Tooze, S. A. és Yoshimori, T. (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12(9): 831-5.
- Tsukada, M. és Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333(1-2): 169-74.
- Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A. és Mizushima, N. (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321(5885): 117-20.
- Velentzas, P. D., Velentzas, A. D., Mpakou, V. E., Antonelou, M. H., Margaritis, L. H., Papassideri, I. S. és Stravopodis, D. J. (2013) Detrimental effects of proteasome inhibition activity in *Drosophila melanogaster*: implication of ER stress, autophagy, and apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 29(1): 13-37.
- Velentzas, P. D., Velentzas, A. D., Mpakou, V. E., Papassideri, I. S., Stravopodis, D. J. és Margaritis, L. H. (2011) Proteasome inhibition induces developmentally deregulated programs of apoptotic and autophagic cell death during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Cell Biol Int* 35(1): 15-27.
- Wong, E. és Cuervo, A. M. (2010) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a006734.
- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M. és Ohsumi, Y. (2012) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol* 198(2): 219-33.
- Yao, T. és Ndoja, A. (2012) Regulation of gene expression by the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cell Dev Biol* 23(5): 523-9.
- Youle, R. J. és Narendra, D. P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 9-14.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., Gonzalez, F. J. és Semenza, G. L. (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283(16): 10892-903.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok:

Dr. Juhász Gábornak, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette, hogy a Juhasz Lab csapatában dolgozhassak és készítsem el doktori munkámat, valamint a folyamatos szakmai segítségért az elméleti és gyakorlati munka minden területén.

Dr. Lőw Péternek, tanszékvezetőnek és szerzőtársamnak, hogy lehetővé tette munkám elvégzését az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszékén, és a közös munka során nyújtott segítségért és támogatásért.

Prof. Erdei Annának és Prof. Sass Miklósnak, hogy lehetővé tették az ELTE Molekuláris sejt- és neurobiológia doktori programban való részvételt.

Nagy Péter és Pircs Karolina munkatársamnak, valamint a labor többi tagjának a sok segítségért, a közös munkáért és a jó hangulatért. Szatmári Zsuzsannának a regresszió analízis vizsgálatokban nyújtott segítségért.

Pálfia Sarolta asszisztensnek technikai segítségéért, ami megkönnyítette a mindennapi munkánkat.

Agatics Róbertnek, családomnak és barátaimnak, hogy a kiegyensúlyozott magánélet megteremtésével hozzájárultak doktori munkám elkészüléséhez.

11. FÜGGELÉK

1. függelék A kísérletek során felhasznált törzsek listája. A táblázat tartalmazza a törzs nevet, CG számot, hivatkozásokat és genotípust/transformant ID-t a dolgozatban való megjelenésük sorrendjében. (BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center; VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center)

Törzs név	CG szám	Hivatkozás	Genotípus/transformant ID
kontroll		BDSC	w[1118]
mCherry-Atg8a, GFP		saját törzs	hs-Flp; UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-GFPnls, r4-mCherry-Atg8a
mCherry-GFP-Atg8a		saját törzs	hs-Flp; UAS-Dcr2; Act>CD2>Gal4, UAS-mCherry-GFP-Atg8a
Lamp1-GFP		saját törzs	hs-Flp; UAS-Lamp1GFP; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2
GFP-CL1		Pandey és mtsai, 2007	UAS-GFP-CL1
Prosa1↓	CG18495	VDRC	GD49681
Prosa3T↓	CG1736	VDRC	GD32889
Prosa5↓	CG10938	VDRC	KK108380
Prosa6↓	CG30382	BDSC	JF02711
Prosa7↓	CG1519	VDRC	KK102016
Pros25↓	CG5266	VDRC	KK101409
Pros28.1↓	CG3422	VDRC	KK105712
Pros29↓	CG9327	VDRC	KK104373
Prosβ2↓	CG3329	VDRC	KK103575
Prosβ3↓	CG11981	VDRC	KK100561
Prosβ4↓	CG17331	VDRC	GD19079
Prosβ5↓	CG12323	VDRC	KK107628
Prosβ7↓	CG12000	VDRC	KK101990
Pros26↓	CG4097	VDRC	KK105673
Pros45↓	CG1489	VDRC	KK100620

Rpt1↓	CG1341	VDRC	KK108834
Rpt3↓	CG16916	VDRC	KK100681
Rpt4↓	CG3455	BDSC	HMS00661
Tbp-1↓	CG10370	BDSC	HMS00417
Mov34↓	CG3416	VDRC	KK108573
Rpn1↓	CG7762	VDRC	KK103939
Rpn2↓	CG11888	VDRC	KK106457
Rpn5↓	CG1100	VDRC	GD18676
Rpn7↓	CG5378	VDRC	KK101467
Rpn9↓	CG10230	VDRC	KK103733
Rpn11↓	CG18174	BDSC	HMS00071
Pomp↓	CG9324	VDRC	KK100628
act-Gal4		BDSC	
hs-Gal4		BDSC	
cg-Gal4		BDSC	
GFP-Atg8a		saját törzs	hs-Flp; UAS-GFP-Atg8a; Act>CD2>Gal4, UAS-Dcr2
sima↑	CG7951	BDSC	UAS-sima
Vhl↓	CG13221	VDRC	KK108920
mCD8-GFP		BDSC	hs-Flp, Act>CD2>Gal4, mCD8-GFP
sima↓1	CG7951	BDSC	JF02105
sima↓2	CG7951	BDSC	HMS00832
sima↓3	CG7951	BDSC	HMS00833
BNIP3↓	CG5059	VDRC	KK107493
p62↓↓	CG10360	VDRC, BDSC	KK108193, HMS00938
p62↓	CG10360	BDSC	HMS00551
Atg1DN↑	CG10967	Scott és mtsai, 2007	UAS-Atg1[KQ]
Atg1↓	CG10967	BDSC	JF02273

Vps34DN↑	CG5373	Juhasz és mtsai, 2008	UAS-Vps34[KD]
Atg9↓	CG3615	BDSC	JF02891
Atg4DN↑	CG4428	Pircs és mtsai, 2012	UAS-Atg4[DN]
Atg12↓	CG10861	BDSC	JF02704
Atg18b↓	CG8678	VDRC	KK100536

2. függelék A dolgozatban szereplő statisztikai kiértékelések. Minden esetben fel van tüntetve a genotípus, az átlag, a standard error, a mintaszám (n), a normalitás és az alkalmazott teszt. A $p < 0,05$ értékeket statisztikailag szignifikáns eltérésnek tekintettük, a nem szignifikáns p értékeket szürke háttérrel emeltük ki. Az oszlopdiagrammokon az átlagot és a standard errort ábrázoltuk.

18. ábra	G panel	genotípus	GFP-CL1 aggregátum (terület %)					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,0000	0,0000		20	NEM	
		Prosa1↓	11,4888	1,1778	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa3T↓	0,0000	0,0000	1,0000	16	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa5↓	7,2527	0,9176	0,0240	15	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa6↓	13,2863	1,7206	0,0000	14	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa7↓	12,0737	1,6083	0,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Pros25↓	0,0000	0,0000	1,0000	17	NEM	Kruskal Wallis
		Pros28.1↓	0,0000	0,0000	1,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Pros29↓	0,0000	0,0000	1,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ2↓	13,7068	1,6943	0,0000	14	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ3↓	11,5171	1,2135	0,0000	19	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ4↓	11,9173	1,9608	0,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ5↓	11,2823	1,2271	0,0000	13	NEM	Kruskal Wallis

		Prosβ7↓	9,4338	0,9275	0,0100	15	NEM	Kruskal Wallis
		Pros26↓	12,5293	1,5859	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Pros45↓	11,3845	1,3273	0,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt1↓	9,6376	1,3166	0,0100	10	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt3↓	0,0000	0,0000	1,0000	17	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt4↓	7,1195	1,3701	0,0400	14	NEM	Kruskal Wallis
		Tbp-1↓	13,7287	1,7674	0,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Mov34↓	13,1841	1,6357	0,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn1↓	12,8793	1,5837	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn2↓	13,7606	2,1240	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn5↓	1,6245	0,3196	1,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn7↓	9,9278	1,8093	0,0080	10	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn9↓	0,0000	0,0000	1,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn11↓	12,6117	1,2912	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Pomp↓	7,3072	0,7276	0,0400	20	NEM	Kruskal Wallis
19. ábra	F panel	genotípus	p62 aggregátum (terület %)					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,7419	0,2248		26	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa1↓	32,0174	4,9963	0,0000	7	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa3T↓	2,4330	0,5137	1,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa5↓	16,0902	1,4202	0,0050	14	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa6↓	26,4776	4,1925	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Prosa7↓	27,1723	8,3163	0,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Pros25↓	0,5393	0,1157	1,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Pros28.1↓	2,3646	0,3034	1,0000	14	NEM	Kruskal Wallis

		Pros29↓	2,5959	0,3316	1,0000	17	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ2↓	34,9510	3,3922	0,0000	23	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ3↓	25,2381	2,8896	0,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ4↓	22,3430	3,5416	0,0010	9	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ5↓	20,6479	1,9693	0,0000	19	NEM	Kruskal Wallis
		Prosβ7↓	15,0539	1,4860	0,0020	20	NEM	Kruskal Wallis
		Pros26↓	18,3553	2,7396	0,0010	13	NEM	Kruskal Wallis
		Pros45↓	20,4290	1,8680	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt1↓	31,8719	3,3665	0,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt3↓	0,9077	0,2408	1,0000	6	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt4↓	37,4939	9,0945	0,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Tbp-1↓	29,5670	3,5244	0,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Mov34↓	20,2263	3,1534	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn1↓	28,3551	2,9174	0,0000	18	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn2↓	28,6306	2,9480	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn5↓	5,5147	0,9348	1,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn7↓	34,8209	2,8172	0,0000	18	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn9↓	3,8710	0,6255	1,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Rpn11↓	25,5662	2,2606	0,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Pomp↓	11,6515	1,7058	0,0020	12	NEM	Kruskal Wallis
22. ábra	F panel	genotípus	normalizált LTR pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,2542	0,1741		12	NEM	
		Prosa1↓	158,5058	12,3610	0,0000	12	IGEN	u teszt
		kontroll	0,5624	0,2902		16	NEM	

		Pro α 5↓	43,4047	10,6200	0,0026	16	IGEN	u teszt
		kontroll	0,3151	0,2902		10	NEM	
		Pro β 2↓	70,8717	11,6066	0,0000	10	IGEN	u teszt
		kontroll	0,6002	0,2902		14	NEM	
		Rpt1↓	68,9728	14,9725	0,0000	14	NEM	u teszt
		kontroll	0,3094	0,1741		12	NEM	
		Rpn2↓	68,9563	9,2272	0,0000	12	IGEN	u teszt
23. ábra	F panel	genotípus	normalizált Atg8a pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	3,3937	1,0446		10	IGEN	
		Pro α 1↓	77,3088	10,1558	0,0000	10	IGEN	t teszt
		kontroll	4,7576	1,6830		9	NEM	
		Pro α 5↓	43,7360	18,3965	0,0003	9	IGEN	u teszt
		kontroll	1,6713	0,8125		10	NEM	
		Pro β 2↓	132,7566	25,4765	0,0000	10	IGEN	u teszt
		kontroll	4,7045	2,8436		9	IGEN	
		Rpt1↓	125,0057	7,0220	0,0002	9	IGEN	t teszt
		kontroll	4,5178	1,9731		10	NEM	
		Rpn2↓	97,3249	13,2315	0,0000	10	IGEN	u teszt
25. ábra	F panel	genotípus	normalizált mCherry+ GFP- pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		Pro α 1↓ kontroll	164,2962	28,9585		13	IGEN	
		Pro α 1↓ CQ	20,8538	3,9462	0,0011	14	IGEN	t teszt
		Pro α 5↓ kontroll	26,4919	8,7630		13	NEM	

		Prosa5↓ CQ	20,4579	4,2944	0,8206	19	IGEN	u teszt
		Prosβ2↓ kontroll	146,2887	28,5522		13	IGEN	
		Prosβ2↓ CQ	41,4990	5,8033	0,0033	28	IGEN	t teszt
		Rpt1↓ kontroll	82,5127	14,7404		13	IGEN	
		Rpt1↓ CQ	10,8375	3,2498	0,0004	11	IGEN	t teszt
		Rpn2↓ kontroll	111,1968	16,4233		13	IGEN	
		Rpn2↓ CQ	14,0115	3,5400	0,0000	17	NEM	u teszt
26. ábra	C panel	genotípus	aggregátum citoplazma %					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,0000	0,0000		9	NEM	
		Rpn2↓	6,9732	5,8148	0,0000	9	IGEN	u teszt
		genotípus	autofagoszóma citoplazma %					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,0000	0,0000		9	NEM	
		Rpn2↓	0,0641	0,0825	0,0040	9	IGEN	u teszt
		genotípus	autolizoszóma citoplazma %					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,0000	0,0000		9	NEM	
		Rpn2↓	0,2500	0,4034	0,0040	9	IGEN	u teszt
27. ábra	C panel	genotípus	normalizált LTR pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,1358	0,1161		12	NEM	

		sima↑	145,7692	16,5974	0,0000	12	IGEN	u teszt
		kontroll	0,5719	0,2902		12	NEM	
		Vhl↓	46,0799	3,7141	0,0000	12	IGEN	u teszt
	F panel	genotípus	normalizált mCherry-Atg8a pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		kontroll	0,5788	0,3482		12	NEM	
		sima↑	116,7996	19,0929	0,0000	12	IGEN	u teszt
		kontroll	0,4107	0,2902		12	NEM	
		Vhl↓	68,8238	12,4191	0,0000	12	NEM	u teszt
	K panel	genotípus	normalizált mCherry+ GFP- pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		sima↑ kontroll	105,8164	22,3427		13	NEM	
		sima↑ CQ	34,3804	10,5620	0,0434	9	IGEN	u teszt
		Vhl↓ kontroll	41,5474	6,0935		13	IGEN	
		Vhl↓ CQ	9,2457	2,4374	0,0002	18	IGEN	t teszt
29. ábra	G panel	genotípus	normalizált LTR pötty szám/sejt					
			átlag	standard error	p	n	normalitás	
		Prosβ2↓ kontroll	70,8717	11,6066		10	IGEN	
		sima↓1	31,5604	12,5932	0,0258	16	IGEN	ANOVA
		sima↓2	35,5038	8,2407	0,1336	13	IGEN	ANOVA
		sima↓3	22,0739	9,4594	0,0220	17	NEM	Kruskal Wallis
		BNIP3↓	7,7151	2,4374	0,0000	12	IGEN	ANOVA
		p62↓↓	34,4908	6,4997	0,0867	14	IGEN	ANOVA

		Atg1DN↑	6,2364	5,2810	0,0020	8	NEM	Kruskal Wallis
		Atg1↓	22,9173	9,9817	0,5340	11	NEM	Kruskal Wallis
		Vps34DN↑	5,0560	2,0312	0,0010	13	NEM	Kruskal Wallis
		Atg9↓	1,5034	0,8125	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Atg4DN↑	1,2895	1,2767	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Atg12↓	2,2473	1,7990	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Atg18b↓	56,9857	8,2987	1,0000	16	NEM	Kruskal Wallis
		Rpt1↓ kontroll	68,9728	14,9725		14	NEM	
		sima↓1	5,2223	1,6830	0,0240	18	NEM	Kruskal Wallis
		sima↓2	8,9002	5,6872	0,0010	12	NEM	Kruskal Wallis
		sima↓3	17,2999	8,7630	0,1520	11	NEM	Kruskal Wallis
		BNIP3↓	5,4417	0,0000	0,0020	10	IGEN	Kruskal Wallis
		p62↓↓	26,9763	5,8033	1,0000	15	IGEN	Kruskal Wallis
		Atg1DN↑	1,3551	0,5223	0,0010	12	NEM	Kruskal Wallis
		Atg1↓	0,8625	0,3482	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Vps34DN↑	0,7441	0,4643	0,0000	13	NEM	Kruskal Wallis
		Atg9↓	0,1126	0,1161	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Atg4DN↑	0,2677	0,2902	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Atg12↓	0,2630	0,1741	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Atg18b↓	70,0399	8,6469	1,0000	12	IGEN	Kruskal Wallis
		Rpn2↓ kontroll	68,9563	9,2272		12	IGEN	
		sima↓1	1,3618	0,5223	0,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		sima↓2	23,6041	6,5577	0,0000	15	IGEN	ANOVA
		sima↓3	16,6420	6,3256	0,0140	12	NEM	Kruskal Wallis

		BNIP3↓	27,5397	7,0800	0,0005	13	IGEN	ANOVA
		p62↓↓	38,7962	9,8076	1,0000	15	NEM	Kruskal Wallis
		Atg1DN↑	11,1525	2,4374	0,0000	10	IGEN	ANOVA
		Atg1↓	2,3580	0,8125	0,0010	12	NEM	Kruskal Wallis
		Vps34DN↑	0,3869	0,2321	0,0000	10	NEM	Kruskal Wallis
		Atg9↓	5,0624	3,6561	0,0000	11	NEM	Kruskal Wallis
		Atg4DN↑	12,5134	8,1246	0,0030	12	NEM	Kruskal Wallis
		Atg12↓	0,1207	0,1161	0,0000	12	NEM	Kruskal Wallis
		Atg18b↓	75,5484	7,4282	1,0000	12	IGEN	ANOVA
		Rpn2↓ kontroll	68,9563	9,2272		12	IGEN	
		p62↓	79,4790	10,1558	0,4503	12	IGEN	t teszt
		Prosa1↓ kontrol	180,5688	11,5486		12	IGEN	
		sima↓1	41,7908	7,1381	0,0000	12	IGEN	Kruskal Wallis
		sima↓2	50,7049	10,7941	0,0000	14	IGEN	Kruskal Wallis
		sima↓3	31,8679	6,8479	0,0000	16	IGEN	Kruskal Wallis
		p62↓↓	103,8559	10,3299	0,3520	14	IGEN	Kruskal Wallis
		p62↓	114,7223	11,9548	0,9260	13	IGEN	Kruskal Wallis
		Prosa5↓ kontroll	53,0058	11,6066		18	IGEN	
		sima↓1	4,3216	2,8436	0,0150	12	NEM	Kruskal Wallis
		sima↓2	1,1751	0,6964	0,0120	10	NEM	Kruskal Wallis
		sima↓3	2,2508	1,1026	0,0160	14	NEM	Kruskal Wallis
		p62↓↓	54,1211	12,4191	1,0000	11	IGEN	ANOVA